



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής  
Σχολή Επιστημών Τροφίμων  
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
**ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

MSc Thesis

**Εφαρμογές των τεχνικών NGS στα προϊόντα γάλακτος**  
**Applications of NGS techniques in dairy products**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Σεμιλιέτωφ Γεώργιος

Semilietof Georgios

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Τσάκαλη Ευσταθία

Tsakali Efstathia

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024



Faculty of Food Sciences  
Department of Food Science and Technology

Master of Science  
**FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY**

MSc THESIS

**Applications of NGS techniques in dairy products**

Semilietof Georgios

22019

[gsemilietof@yahoo.gr](mailto:gsemilietof@yahoo.gr)

SUPERVISOR

Efstathia Tsakali

AIGALEO 2024

## Επιτροπή Αξιολόγησης Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας

Οι υπογράφουσες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **Έφαρμογές των τεχνικών NGS στα προϊόντα γάλακτος** που παρουσιάστηκε από τον **ΓΕΩΡΓΙΟ ΣΕΜΙΛΙΕΤΩΦ**, υποψηφίου για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Αιγάλεω, 19/09/2024

Ευσταθία Τσάκαλη  
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια/ Επιβλέπουσα

Δήμητρα Χούχουλα  
Καθηγήτρια/ Μέλος

Ανθιμία- Αικατερίνη Μπατρίνου  
Επίκουρος Καθηγήτρια/ Μέλος

## Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

### ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Σεμιλιέτωφ Γεώργιος του Μιχαήλ, με αριθμό μητρώου 22019 φοιτητής του του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Π.Μ.Σ.) «ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής Μηχανικών, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο Δηλών

Σεμιλιέτωφ Γεώργιος



## Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Μιχαήλ Σεμιλιέτωφ ,Βασιλική Δεληγιάννη καθώς και την αδερφή μου Αικατερίνη Σεμιλιέτωφ για όλη την υποστήριξη ψυχολογική και υλική που παρείχαν ώστε να καταφέρω να εκπληρώσω τους στόχους μου σε ακαδημαϊκό επίπεδο. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο τις θερμότερες ευχαριστίες μου στη μέντορα μου σε αυτό το όμορφο και γεμάτο γνώσεις μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών κα. Ευσταθία Τσάκαλη για την εμπιστοσύνη που επέδειξε προς το πρόσωπό μου , το ζήλο και την όρεξη να μεταβιβάσει τις γνώσεις της και την αθρόα υποστήριξη καθ' όλη τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα της ΣΤΑΜΟΥ, δηλαδή το εργασιακό περιβάλλον στο οποίο μετέχω για την κατανόηση και τη στήριξη που μου παρείχαν ώστε να κατακτήσω τους στόχους που είχα θέσει.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	6
ABSTRACT .....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΥΡΙΟΥ.....	10
1.1. Κατηγορίες τυριών .....	10
1.2. Μέθοδος παρασκευής .....	13
1.3. Βασικά χαρακτηριστικά και διατροφική αξία .....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	23
2.1. Μέθοδοι παρασκευής τυρογάλακτος .....	24
2.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τυρογάλακτος .....	25
2.3. Διατροφικά στοιχεία .....	27
2.4. Προϊόντα τυρογάλακτος .....	29
2.5. Ιταλικά τυριά τυρογάλακτος.....	31
2.5.1. Ricotta.....	31
2.6. Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος.....	34
2.6.1. Ανθότυρος.....	34
2.6.2. Μανούρι .....	36
2.6.3. Μυζήθρα.....	37
2.7. Ρουμανικά τυριά τυρογάλακτος.....	39
2.8. Βραζιλιάνικα τυριά τυρογάλακτος .....	40
2.8.1. Requeijão .....	40
2.9. Τυριά τυρογάλακτος από άλλες περιοχές .....	40
2.10. Νέας τεχνολογίας τυριά τυρογάλακτος.....	44
2.11. Θέματα ασφάλειας και συντήρησης τυριών τυρογάλακτος.....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ .....	51
3.1. Ιστορική αναδρομή .....	51
3.2. Αλληλούχιση σύντομης ανάγνωσης .....	53
3.2.1. Πυροαλληλούχιση .....	53
3.2.2. Αλληλούχιση Illumina .....	54
3.2.3. Ion Torrent Sequencing .....	56
3.3. Αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης.....	57
3.3.1. Αλληλούχιση PacBio .....	58
3.3.2. Αλληλούχιση Nanopore .....	59
3.4. Άλλες τεχνολογίες 4ης γενιάς .....	61
3.5. Εφαρμογές .....	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΡΙΩΝ ....	68
4.1. Μελέτη της μικροβιακής κοινότητας.....	69
4.2. Μελέτη της αυθεντικότητας των τυριών.....	76
4.3. Μελέτη της παραγωγικής διαδικασίας .....	78
4.4. Μελέτη της ωρίμανσης.....	83
4.5. Μελέτη της αλλοίωσης .....	87
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ .....	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	93

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τυρί αποτελεί σημαντικό διατροφικό στοιχείο της δίαιτας. Το περιεχόμενο του σε ασβέστιο και πρωτεΐνη καθώς και βιταμίνες το καθιστούν από τα καλύτερα τρόφιμα αν και η υπερβολική κατανάλωση του έχει συσχετισθεί και με ανεπιθύμητα αποτελέσματα λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε αλάτι και λιπαρά. Ωστόσο στο εμπόριο κυκλοφορεί μια τεράστια ποικιλία τυριών το καθένα με τα δικά του ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Μια ειδικότερη κατηγορία τυριών είναι τα τυριά τυρογάλακτος το οποίο είναι παραπροϊόν την παρασκευής του τυριού. Ως παραπροϊόν με υψηλό οργανικό φορτίο είναι σημαντική η χρήση προηγμένων τεχνικών παρακολούθησης της μικροβιακής κοινότητας. Σε αυτό το πλαίσιο η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) φέρνει επανάσταση στη μελέτη και την παραγωγή τυριών ορού γάλακτος παρέχοντας λεπτομερείς πληροφορίες για τις μικροβιακές κοινότητες που εμπλέκονται στη ζύμωση και την ωρίμανση του τυριού. Αυτή η προηγμένη τεχνολογία επιτρέπει την ακριβή αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των βακτηρίων, των ζυμών και των μυκήτων που υπάρχουν στο τυρί ορού γάλακτος, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη της γεύσης, την υφή και τη συνολική ποιότητα. Χρησιμοποιώντας την NGS, οι ερευνητές μπορούν να παρακολουθούν τη μικροβιακή διαδοχή κατά τη διαδικασία παρασκευής τυριού, εντοπίζοντας ωφέλιμους μικροοργανισμούς που ενισχύουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και ανιχνεύοντας επιβλαβή μικρόβια που θα μπορούσαν να αλλοιώσουν το προϊόν. Αυτές οι πληροφορίες επιτρέπουν στους τυροκόμους να βελτιστοποιούν τις συνθήκες ζύμωσης, να επιλέγουν κατάλληλες καλλιέργειες εκκίνησης και να βελτιώνουν τις πρακτικές υγιεινής για να εξασφαλίσουν σταθερή ποιότητα και ασφάλεια. Επιπλέον, η NGS μπορεί να βοηθήσει στον έλεγχο της ταυτότητας των τυριών ορού γάλακτος επαληθεύοντας την παρουσία συγκεκριμένων μικροβιακών υπογραφών που σχετίζονται με παραδοσιακές και βιοτεχνικές μεθόδους παραγωγής. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην προστασία των τοπικών ποικιλιών τυριού και να στηρίξει τις προσπάθειες μάρκετινγκ επιβεβαιώνοντας τα μοναδικά χαρακτηριστικά αυτών των προϊόντων.



## **ABSTRACT**

Cheese is an important nutritional element of the diet. Its content in calcium and protein as well as vitamins make it one of the best foods, although its excessive consumption has also been associated with undesirable effects due to its high salt and fat content. However, there is a huge variety of cheeses on the market, each with its own particular organoleptic characteristics. A more special category of cheeses are the cheese milk cheeses which are a by-product of the cheese making. As a by-product with a high organic load, the use of advanced microbial community monitoring techniques is important. In this context next-generation sequencing (NGS) is revolutionizing the study and production of whey cheeses by providing detailed information on the microbial communities involved in cheese fermentation and ripening. This advanced technology enables accurate identification and quantification of the bacteria, yeasts and fungi present in whey cheese, which are vital to flavor development, texture and overall quality. Using NGS, researchers can track the microbial succession during the cheese-making process, identifying beneficial microorganisms that enhance desired characteristics and detecting harmful microbes that could spoil the product. This information allows cheesemakers to optimize fermentation conditions, select appropriate starter cultures, and improve hygiene practices to ensure consistent quality and safety. In addition, NGS can assist in the authentication of whey cheeses by verifying the presence of specific microbial signatures associated with traditional and artisanal production methods. This can help protect local cheese varieties and support marketing efforts by confirming the unique characteristics of these products.

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το τυρί είναι ένα γαλακτοκομικό προϊόν που παράγεται από γάλα και το οποίο παράγεται σε ένα ευρύ φάσμα γεύσεων, υφών και μορφών με πήξη της πρωτεΐνης γάλακτος καζεΐνης. Περιλαμβάνει πρωτεΐνες και λίπος από το γάλα, και παρασκευάζεται συνήθως από γάλα αγελάδων, βουβάλων, αιγών ή προβάτων. Παράγονται σε διαφορετικές υφές και γεύσεις ενώ διαφέρουν μεταξύ τους και ως προς τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Το τυρί είναι ένα αρχαίο τρόφιμο του οποίου η προέλευση προηγείται της καταγεγραμμένης ιστορίας. Δεν υπάρχουν τεκμηριωμένα στοιχεία που να δείχνουν πού προέκυψε η τυροκομία, είτε στην Ευρώπη, την Κεντρική Ασία ή τη Μέση Ανατολή, αλλά η πρακτική είχε εξαπλωθεί στην Ευρώπη πριν από τους Ρωμαϊκούς χρόνους και, σύμφωνα με τον Πλίνιο, είχε γίνει μια εξελιγμένη επιχείρηση από τη στιγμή που ήταν αυτοκράτορας ο Ρωμαίος Η (Johnson, 2017).

Οι παλαιότερες προτεινόμενες ημερομηνίες για την απαρχή της παραγωγής τυριών κυμαίνονται από περίπου 8000 π.Χ., όταν τα πρόβατα εξημερώθηκαν για πρώτη φορά. Δεδομένου ότι τα δέρματα ζώων και τα διογκωμένα εσωτερικά όργανα έχουν, από την αρχαιότητα, χρησιμοποιηθεί ως δοχεία αποθήκευσης για μια σειρά τροφίμων, είναι πιθανό η διαδικασία παραγωγής τυριού να ανακαλύφθηκε τυχαία με την αποθήκευση γάλακτος σε δοχείο από το στομάχι ενός ζώου, με αποτέλεσμα το γάλα να μετατρέπεται σε πούδρα και ορός γάλακτος από την πυτιά από το στομάχι.

Οι πρώτες αποδείξεις της παραγωγής τυριών στην ιστορία χρονολογούνται από το 5500 π.Χ. και απαντώνται σε αυτό που είναι τώρα το Kujawy της Πολωνίας, όπου έχουν βρεθεί ιχνοστοιχεία επικαλυμμένα με λιπαρά μόρια γάλακτος. Έκτοτε ο κλάδος αναπτύχθηκε και έχουμε φτάσει στη σημερινή εποχή να λαμβάνουμε μια μεγάλη ποικιλία ειδών. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα πρώτα τυριά ήταν πολύ διαφορετικά σε σχέση με τη μορφή που έχουν σήμερα. Τα αρχικά τυριά πιθανότατα ήταν ξινά και αλμυρά, παρόμοια σε υφή με ρουστίκ τυρί cottage ή φέτα, ένα εύθρυπτο, γευστικό ελληνικό τυρί. Τα τυριά που παράγονταν στην Ευρώπη, όπου τα κλίματα είναι πιο δροσερά από τη Μέση Ανατολή, απαιτούσαν λιγότερο αλάτι για συντήρηση. Με λιγότερο αλάτι και οξύτητα, το τυρί έγινε κατάλληλο περιβάλλον για χρήσιμα μικρόβια, δίνοντας στα ώριμα τυριά τις αντίστοιχες γεύσεις. Το παλαιότερο

διατηρημένο τυρί βρέθηκε στην έρημο Taklamakan στο Xinjiang της Κίνας και χρονολογείται από το 1615 π.Χ. (Kindstedt, 2017).

Βασικό παραπροϊόν της παραγωγής του τυριού είναι το τυρόγαλα. Αποτελεί ένα επιβαρυντικό για το περιβάλλον προϊόν και για αυτό όλο και περισσότεροι ερευνητές στοχεύουν στην αξιοποίηση του. Μια σημαντική κατηγορία προϊόντων που προέρχονται από το τυρόγαλα είναι τα τυριά τυρογάλακτος. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να παρουσιάσει τις τεχνολογίες αιχμής που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τυριών τυρογάλακτος και συγκεκριμένα των νέων τεχνολογιών αλληλούχισης που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των μικροβίων που συναντώνται σε όλα τα στάδια παραγωγής και συντήρησης των τυριών τυρογάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο κεφάλαιο θα αναφερθεί ο τρόπος παρασκευής τυριών και η διαδικασία που ακολουθείται γενικά. Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναφερθούν τα βασικά χαρακτηριστικά του τυρογάλακτος και ειδικότερα θα αναλυθούν τα τυριά που παρασκευάζονται από τυρόγαλα. Στο τρίτο κεφάλαιο θα αναλυθούν οι βασικές μέθοδοι αλληλούχισης νέας γενιάς ενώ στο τελευταίο κεφάλαιο θα αναφερθούν μελέτες που αφορούν την χρήση των τεχνολογιών αλληλούχισης για τα τυριά τυρογάλακτος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΥΡΙΟΥ

Ο κλάδος της τυροκομίας αποτελεί έναν από τους πιο ανεπτυγμένους κλάδους σε πολλές χώρες. Το 1980, η παγκόσμια παραγωγή τυριού ήταν 8,7 εκατομμύρια τόνοι και αυτό δαπανήθηκε σε 11,4 εκατομμύρια τόνους το χρόνο το 1990 και από τη στροφή της χιλιετίας η παραγωγή έφτασε τα 15,4 εκατομμύρια και σχεδόν διπλασιάστηκε το 1980. Η παγκόσμια παραγωγή τυριού έφθασε το 20 εκατομμύρια τόνους παραγωγής ΜΤ το 2011 και η καλλιέργεια συνεχίστηκε το 2012 και το 2013. Γενικά το τυρί από αγελαδινό γάλα που παραδίδεται στα γαλακτοκομεία αντιπροσωπεύει πάνω από το 80% του γάλακτος στην παγκόσμια φυσική παραγωγή τυριού. Το υπόλοιπο αποτελείται από αγροτικά και οικιακά προϊόντα, αλλά επίσης τυριά από άλλα γάλατα (πρόβατα, κασίκια και βουβάλια).

Η Ευρώπη και η Βόρεια Αμερική παράγουν περισσότερο από το 75% της παγκόσμιας τυροκομίας. Οι 5 κύριες παραγωγές χώρες είναι οι ΗΠΑ, η Γερμανία, Η Γαλλία, η Ιταλία και η Ολλανδία. Η ΕΕ και οι ΗΠΑ αντιπροσωπεύουν το 70% της παγκόσμιας παραγωγής τυριού το 2012 και αναμένεται να παρουσιάσει δυναμική ανάπτυξη μέχρι το 2024, όπου η παραγωγή θα ανέλθει σύμφωνα με εκτιμήσεις σε 16,6 εκατομμύρια . Ωστόσο, το σχετικό μερίδιο της παγκόσμιας παραγωγής τυριού θα μειωθεί σε 66% το 2024 λόγω της σχετικά υψηλότερης ανάπτυξης σε όλες τις άλλες περιοχές του κόσμου εκτός από άλλες χώρες της Ευρώπης (Pm Food and dairy Consulting. 2014).

Όσον αφορά την κατανάλωση γενικά η Ευρώπη φαίνεται να είναι η ήπειρος που επικρατεί στον παγκόσμιο χάρτη του τυριού. Η Δανία διαθέτει το υψηλότερο επίπεδο κατανάλωσης τυριού ανά κάτοικο. Το 2016, οι Δανοί έτρωγαν κατά μέσο όρο 28,1 χιλιόγραμμα τυριού. Η Ισλανδία και η Φινλανδία ήρθαν στη δεύτερη και στην τρίτη χώρα εκείνη την χρονιά σε 27,7 και 27,3 χιλιόγραμμα τυριού κατά κεφαλήν (<https://www.statista.com>).

### 1.1. Κατηγορίες τυριών

Οι τύποι τυριών ομαδοποιούνται ή ταξινομούνται σύμφωνα με κριτήρια όπως η διάρκεια της ζύμωσης, η υφή, οι μέθοδοι παρασκευής, η περιεκτικότητα σε λίπος, το είδος του γάλακτος, η χώρα ή η περιοχή προέλευσης κλπ. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται συνηθέστερα και παραδοσιακά βασίζεται στην περιεκτικότητα σε

υγρασία στη συνέχεια, περιορίζεται περαιτέρω από την περιεκτικότητα σε λίπος και τις μεθόδους ωρίμανσης. Τα κριτήρια μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, χωρίς να χρησιμοποιείται καθολικά κανένας μεμονωμένος τρόπος (Fox et al. 2000).

Υπάρχουν περίπου 2.000 διαφορετικά είδη τυριών στον κόσμο, με πάνω από 400 να είναι τα πιο γνωστά (Fox, 1993). Οι τεχνικές συντήρησης και ωρίμανσης του τυριού ενδέχεται να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το επίπεδο υγρασίας. Αυτά τα τυριά παρασκευάζονται από μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα, έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία και παλαιώνουν αργά (πάνω από 1-2 χρόνια) παρουσία βακτηρίων. Ο χρόνος ωρίμανσης των σκληρών τυριών, όπως το τσένταρ και το καζάκ, είναι τρεις έως δώδεκα μήνες, ενώ των ημίσκληρων τυριών είναι δύο έως τρεις μήνες. Το τυρόπηγμα οξινίζεται πριν από το αλάτισμα και το πάτημα. Τα ημιμαλακά τυριά, όπως το μπλε τυρί, ωριμάζουν με μύκητες (*Penicillium*) ή βακτήρια (*Brevibacterium*). Τις περισσότερες φορές κατά την ωρίμανση, η μούχλα αναπτύσσεται στην επιφάνεια ορισμένων τυριών (όπως το Camembert) ενώ αναπτύσσεται κάτω από την επιφάνεια άλλων τυριών του ίδιου είδους (όπως το μπλε τυρί) καθώς παλαιώνουν (Zheng et al., 2021).

Με βάση την ηλικία που θεωρείται και ο σημαντικότερος παράγοντας τα τυριά διακρίνονται σε νωπά, τυριά τυρογάλακτος και τυριά ωρίμανσης. Τα νωπά τυριά χωρίς πρόσθετα συντηρητικά μπορούν να αλλοιωθούν σε λίγες μέρες. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το τυρί cottage, το τυρί κρέμας, το , το queso fresco, το paneer και το φρέσκο κατσικίσιο γάλα chèvre. Αυτά τα τυριά συχνά είναι μαλακά και αλοιφόμενα, με ήπια γεύση. Τα τυριά τυρογάλακτος είναι νωπά τυριά από ορό γάλακτος, ένα παραπροϊόν από τη διαδικασία παραγωγής άλλων τυριών που διαφορετικά θα απορρίπτονταν. Η Corsican brocciu, η ιταλική ricotta, η ρουμανική urda, η ελληνική μυζήθρα, το κυπριακό τυρί anari, τα chhurpi από την περιοχή των Ιμαλαίων και το νορβηγικό Brunost είναι παραδείγματα αυτής της κατηγορίας. Τα ώριμα τυριά αφήνονται σε ειδικές συνθήκες για καθορισμένο ώστε να ωριμάσουν και να αποκτήσουν επιπρόσθετες οργανοληπτικές ιδιότητες (Fox et al. 2000).

Η κατηγοριοποίηση των τυριών ανάλογα με την περιεκτικότητα σε υγρασία είναι μια κοινή αλλά ανακριβής ως πρακτική. Τα όρια ανάμεσα σε μαλακά, ημι-μαλακά, ημίσκληρα και σκληρά είναι αυθαίρετα και πολλοί τύποι τυριών γίνονται σε

μαλακότερες ή σταθερότερες παραλλαγές. Ο παράγοντας που ελέγχει τη σκληρότητα του τυριού είναι η περιεκτικότητα σε υγρασία, η οποία εξαρτάται από την πίεση που ασκείται κατά τη διαδικασία της μορφοποίησης και κατά τον χρόνο ωρίμανσης (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

Ορισμένα τυριά κατηγοριοποιούνται με βάση την προέλευση του γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους ή από την προστιθέμενη περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες του γάλακτος από το οποίο παράγονται. Ενώ το μεγαλύτερο μέρος του εμπορεύσιμου τυριού του κόσμου είναι φτιαγμένο από αγελαδινό γάλα, σε διάφορα μέρη του κόσμου γίνεται Παρασκευή τυροκομικών με τη χρήση πρόβειου και γίδινου γάλακτος. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το Roquefort (που παράγεται στη Γαλλία) και το Pecorino (που παράγεται στην Ιταλία) από γάλα προβάτου (Fox, et al. 2000).

Υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες τυριών, στις οποίες η παρουσία μυκήτων δηλαδή, μούχλας είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό: μαλακά ωριμασμένα τυριά, ωριμασμένα και μπλε τυριά. Τα μαλακά ωριμασμένα τυριά έχουν απόκτησει σώμα αλλά παρουσιάζουν πιο χαλαρή υφή και ωριμάζουν από το εξωτερικό προς το εσωτερικό. Το καλούπι μπορεί να είναι μια βελούδινη άνθηση του *P. camemberti* που σχηματίζει μια εύκαμπτη λευκή κρούστα και συμβάλλει στην ομαλή υφή και στις πιο έντονες γεύσεις αυτών των ωριμασμένων τυριών. Το Brie και το Camembert, τα πιο διάσημα από αυτά τα τυριά, παρασκευάζονται επιτρέποντας στη λευκή μούχλα να αναπτύσσεται στο εξωτερικό μέρος του τυριού για μερικές ημέρες ή εβδομάδες (Kure et al., 2019).

Το λεγόμενο μπλε τυρί δημιουργείται με εμβολιασμό ενός τυριού με *Penicillium roqueforti* ή *Penicillium glaucum*. Αυτό γίνεται ενώ το τυρί εξακολουθεί να έχει τη μορφή χαλαρά συμπιεσμένων τυρογάλακτων και μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με τη διάτρηση ενός μπλοκ ωρίμανσεως τυριού με σουβλάκια σε μια ατμόσφαιρα στην οποία το καλούπι είναι διαδεδομένο. Αυτά τα τυριά έχουν ξεχωριστές μπλε στίγματα, που τους δίνουν το όνομά τους και, συχνά, δυναμικές γεύσεις. Η υφή τους μπορεί να είναι μαλακή ή πιο στέρεη. Μερικά από τα πιο γνωστά τυριά ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, το καθένα με το δικό του ιδιαίτερο χρώμα, γεύση, υφή και άρωμα. Περιλαμβάνουν τα Roquefort, Gorgonzola και Stilton (Fox P. 1999).

Τα τυριά άλμης σε αεροστεγές ή ημιδιαπερατό δοχείο. Αυτή η διαδικασία δίνει στο τυρί καλή σταθερότητα, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των βακτηρίων ακόμη και σε θερμές χώρες. Τα τυριά αυτού του τύπου μπορεί να είναι μαλακά ή σκληρά, ποικίλλουν σε περιεκτικότητα σε υγρασία και σε χρώμα και γεύση, ανάλογα με τον τύπο γάλακτος που χρησιμοποιείται, αν και όλα θα είναι χωρίς φλοιό και γενικά γεύση καθαρά, αλμυρά και όξινα όταν είναι φρέσκα, αναπτύσσουν κάποια πικάντικη γεύση όταν ωριμάζουν και τα περισσότερα θα είναι λευκά. Οι ποικιλίες τυριών άλμης περιλαμβάνουν τη φέτα, το χαλούμι, κ.λ.π. (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών).

Το μεταποιημένο τυρί είναι κατασκευασμένο από παραδοσιακό τυρί και γαλακτωματοποιητικά άλατα, περισσότερο αλάτι, συντηρητικά και χρωστικές. Η υφή του είναι συνεπής και λιώνει ομαλά. Πωλείται συσκευασμένο και είτε προ-τεμαχισμένο είτε σε τεμάχια, σε διάφορες ποικιλίες. Διατίθεται επίσης ως "Easy Cheese", ένα προϊόν που διανέμεται από τη Mondelez International, το οποίο συσκευάζεται σε δοχεία αεροζόλ και διατίθεται σε ορισμένες χώρες.

Ορισμένες, αν όχι οι περισσότερες, ποικιλίες μορφοποιημένων τυριών παρασκευάζονται με συνδυασμό πραγματικών τυροκομικών παραπροϊόντων (που καθαρίζονται με ατμό, βρασμένα και περαιτέρω επεξεργασμένα), σκόνες ορού γάλακτος και διάφορα μίγματα φυτικών, φοινικέλαιων ή λιπών. Ορισμένες φέτες επεξεργασμένου τυριού περιέχουν μόλις δύο έως έξι τοις εκατό τυρί. Μερικοί έχουν γεύσεις καπνού που προστίθενται (Preedy V., Watson R., Patel V. 2013).

## **1.2. Μέθοδος παρασκευής**

Η παραγωγή τυριού περιλαμβάνει ορισμένα βασικά στάδια που είναι κοινά για τους περισσότερους τύπους τυριών. Θα αναφερθούμε μόνο σε αυτά και δεν θα δοθούν επιπρόσθετες λεπτομέρειες για κάθε μια κατηγορία ξεχωριστά. Υπάρχουν επίσης και άλλοι τρόποι παρασκευής που είναι συγκεκριμένοι για ορισμένες ποικιλίες.

Το γάλα τυριού υποβάλλεται σε προκατεργασία, ενδεχομένως προ-ωριμάζεται μετά την προσθήκη μιας βακτηριακής καλλιέργειας κατάλληλης για τον τύπο τυριού και αναμιγνύεται με πυτιά. Η ενζυμική δραστηριότητα της πυτίας προκαλεί την πήξη του γάλακτος σε ένα στερεό πήκτωμα γνωστό ως θρόμβο. Αυτό κόβεται με ειδικά

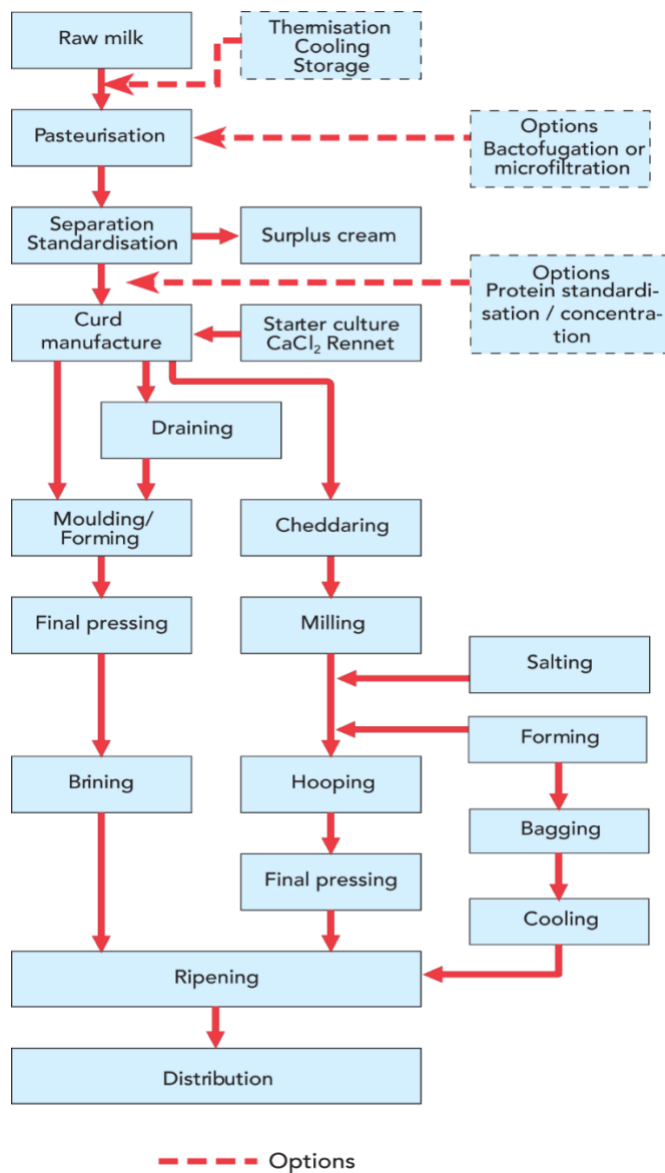
εργαλεία κοπής σε μικρούς κύβους του επιθυμητού μεγέθους - κυρίως για να διευκολύνεται η αποβολή του ορού γάλακτος.

Κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης διαδικασίας πήξης, τα βακτήρια αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν γαλακτικό οξύ από τη λακτόζη. Οι κόκκοι πήξης υποβάλλονται σε μηχανική κατεργασία με εργαλεία ανάδευσης, ενώ ταυτόχρονα θερμαίνεται το τυρόπηγμα, σύμφωνα με ένα προκαθορισμένο πρόγραμμα. Η συνδυασμένη επίδραση αυτών των τριών δράσεων - ανάπτυξη βακτηρίων, μηχανική επεξεργασία και θερμική επεξεργασία - οδηγεί σε συναίρεση, δηλαδή απομάκρυνση του ορού γάλακτος από τους σπόρους του τυροπήγατος. Το τελικό τυρόπηγμα τοποθετείται σε τύπους τυριών, κυρίως από πλαστικό, που καθορίζουν το σχήμα και το μέγεθος του τελικού τυριού (Preedy et al., 2013).

Το τυρί πιέζεται είτε με το δικό του βάρος είτε πιο συχνά με την εφαρμογή πίεσης στα καλούπια. Η επεξεργασία κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πήξης, πίεσης, αλατοποίησης και αποθήκευσης καθορίζει τα χαρακτηριστικά του τυριού. Κατά τη διάρκεια του σταδίου ωρίμανσης το τυρί αποθηκεύεται σε ένα προκαθορισμένο συνδυασμό θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας για μια μεταβλητή χρονική περίοδο (μέχρι 18-24 μήνες για ώριμα τυριά με χαμηλό περιεχόμενο σε υγρασία). Οι τελικές οργανοληπτικές ιδιότητες του τυριού καθορίζονται από τις φυσικές και χημικές μεταβολές που εμφανίζονται κατά την ωρίμανση. Στην πραγματικότητα, προσδιορίζεται η βασική σύνθεση και η δομή του τυριού από τις εργασίες παραγωγής τυροπήγατος, αλλά κατά την ωρίμανση αναπτύσσονται η ατομικότητα και τα μοναδικά χαρακτηριστικά κάθε ποικιλίας τυριών. Οι κύριες βιοχημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στο τυρί κατά την ωρίμανση, η οποία οδηγεί στην ανάπτυξη της γεύσης και της υφής του τυριού, περιλαμβάνουν κυρίως τη γλυκόλυση, την πρωτεόλυση και τη λιπόλυση. Επιπλέον, δευτερογενείς αντιδράσεις, όπως η αποφωσφορλίωση πρωτεϊνών και ο μεταβολισμός των αμινοξέων είναι σημαντικοί για την ανάπτυξη άλλων χαρακτηριστικών (Preedy et al., 2013).

Το διάγραμμα ροής της διαδικασίας στο παρακάτω σχήμα δείχνει επίσης την αλάτιση και την αποθήκευση. Τέλος, το τυρί είναι επικαλυμμένο, τυλιγμένο ή συσκευασμένο.





**Εικόνα 1.** Διάγραμμα ροής παραγωγής τυριού (Preddy et al, 2013).

Πολύ σημαντικές στην διεργασία παραγωγής τυριού είναι οι καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται. Οι καλλιέργειες για την παραγωγή τυριού είναι βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) επειδή η κύρια πηγή ενέργειας τους είναι η λακτόζη στο γάλα και το κύριο μεταβολικό τους προϊόν είναι το γαλακτικό οξύ. Υπάρχει μια ευρεία ποικιλία διαθέσιμων βακτηριακών καλλιεργειών που παρέχουν ξεχωριστά χαρακτηριστικά γεύσης και υφής στα τυριά (Preddy et al., 2013).

Οι καλλιέργειες εκκίνησης χρησιμοποιούνται νωρίς στη διαδικασία παραγωγής τυριού για να βοηθήσουν στην πήξη με μείωση του pH πριν από την προσθήκη πυτίας. Ο μεταβολισμός των καλλιεργειών εκκίνησης συμβάλλει στις επιθυμητές

αρωματικές ενώσεις και βοηθά στην πρόληψη της ανάπτυξης οργανισμών αλλοίωσης και παθογόνων παραγόντων. Τυπικά αρχικά βακτήρια περιλαμβάνουν *Lactococcus lactis subsp. lactis* ή *cremoris*, *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* και *Lactobacillus helveticus* (<http://www.milkfacts.info>).

Οι βοηθητικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται για να παρέχουν ή να ενισχύουν τις χαρακτηριστικές γεύσεις και υφές του τυριού. Οι κοινές συμπληρωματικές καλλιέργειες που προστέθηκαν κατά τη διάρκεια της παρασκευής περιλαμβάνουν *Lactobacillus casei* και *Lactobacillus plantarum* για γεύση σε τυρί Cheddar ή χρήση *Propionibacterium freudenreichii* για σχηματισμό οπών στο ελβετικό τυρί. Οι βοηθητικές καλλιέργειες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως επίχρισμα για έκπλυση του εξωτερικού του τυποποιημένου τυριού, όπως η χρήση λευκών ειδών *Brevibacterium* από τυριά gruyere, τούβλου και limburgger.

Τέλος, η μαγιά χρησιμοποιείται σε ορισμένα τυριά για να δώσουν τα χαρακτηριστικά χρώματα και γεύσεις ορισμένων ποικιλιών τυριών. Η ζύμη *Torula* χρησιμοποιείται στο επίχρισμα για την ωρίμανση του τυριού limburgger. Παραδείγματα καλουπιών περιλαμβάνουν το *Penicillium camemberti* σε camembert και brie και *Penicillium roqueforti* σε μπλε τυριά (<http://www.milkfacts.info>).

### **1.3. Βασικά χαρακτηριστικά και διατροφική αξία**

Το κύριο συστατικό στο τυρί είναι το γάλα. Ανάλογα με την προέλευση του γάλακτος το τυρί παρασκευάζεται με τη χρήση γάλακτος αγελάδων, αιγών, προβάτων, βουβαλιών ή μείγματος αυτών. Η χημική του σύσταση αποτελείται σε μεγαλύτερο ποσοστό από πρωτεΐνες και σε μικρότερο από υδατάνθρακες και λίπη. Ο τύπος του πηκτικού που χρησιμοποιείται εξαρτάται από τον τύπο τυριού που επιθυμείται προς παρασκευή. Για τα όξινα τυριά, χρησιμοποιείται μια πηγή οξέος όπως το οξικό οξύ (ξύδι) ή η γλυκονο-λακτόνη (ένα ήπιο για τα τρόφιμα οξύ). Για τυριά άλμης, πυτιά μοσχαριού ή, συνηθέστερα, χρησιμοποιείται πυτιά που παράγεται μέσω μικροβιακής βιοεπεξεργασίας. Το χλωριούχο ασβέστιο προστίθεται μερικές φορές στο τυρί για να βελτιώσει τις ιδιότητες πήξης του γάλακτος. Μπορούν να προστεθούν αρώματα ανάλογα με το τυρί. Μερικά κοινά συστατικά

περιλαμβάνουν βότανα, μπαχαρικά, πικάντικες και γλυκές πιπεριές, και κρασί (Karoor et al., 2007).

Τα βασικά συστατικά του τυριού είναι λίπη, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Το τυρί περιέχει περίπου 66% κορεσμένα, 30% μονοακόρεστα και 4% πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και ως εκ τούτου αποτελεί σημαντική πηγή λίπους στη διατροφή. Το British Heart Foundation συνιστά την χαμηλή πρόσληψη τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά και χοληστερόλης, όπως το τυρί (British Heart Foundation, 2009). Η παρούσα σύσταση βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων μπορεί να αυξήσει τη συνολική και LDL χοληστερόλη, αυξάνοντας έτσι το κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Αυτές οι κατευθυντήριες γραμμές έχουν οδηγήσει στη ζήτηση χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά τυροκομικών από τους καταναλωτές και οι γαλακτοβιομηχανίες ανταποκρίθηκαν στο κέλευσμα της εποχής, με την ανάπτυξη τυροκομικών χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Olson and Johnson, 1990). Το παλμιτικό, το μυριστικό και το στεατικό οξύ είναι τα πιο κοινά κορεσμένα λιπαρά οξέα στο τυρί. Το ελαϊκό οξύ είναι το πιο κοινό ακόρεστο λιπαρό οξύ. Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά για τη διατροφή.

Το τυρί είναι σημαντική πηγή πρωτεΐνης, με συγκέντρωση που κυμαίνεται από περίπου 4 έως 40%. Οι πρωτεΐνες που εξυπηρετούν διάφορες λειτουργίες στο σώμα, συμπεριλαμβανομένων της ρύθμισης των κυττάρων, των οργάνων και των ιστών, με λειτουργία εξαρτώμενη από τα παρόντα αμινοξέα στην πρωτεΐνη (Nelson and Cox, 2005). Οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος αντιπροσωπεύουν μόνο το 2-3% της συνολικής πρωτεΐνης στο τυρί, με το υπόλοιπο να είναι καζεΐνη. Η βιολογική αξία της πρωτεΐνης τυριού είναι μικρότερη από αυτή της συνολικής πρωτεΐνης γάλακτος, λόγω της αποβολής πρωτεϊνών ορού γάλακτος κατά την παραγωγή τυριού. Ωστόσο, ορισμένες από τις πρωτεΐνες στο τυρί είναι πιο εύπεπτες από ό, τι άλλες.

Η λακτόζη, είναι ο κύριος υδατάνθρακας στο γάλα, χάνεται με τον ορό γάλακτος κατά την παραγωγή τυριού. Οποιαδήποτε παραμένουσα λακτόζη ζυμώνεται περαιτέρω σε γαλακτικό οξύ και συνεπώς το τυρί που έχει ωριμάσει είναι ουσιαστικά χωρίς λακτόζη. Αν έχετε δυσανεξία στη λακτόζη, πολλά τυριά, ιδιαίτερα παλαιωμένα τυριά όπως το Cheddar και το Swiss, περιέχουν λίγη ή καθόλου λακτόζη και συχνά είναι καλά ανεκτά (Preedy et al., 2013).

Οι βιταμίνες, εκτός από τη βιταμίνη D, δεν μπορούν να συντεθούν στο σώμα και κατά συνέπεια η πρόσληψη τους μέσω της διατροφής είναι απαραίτητη. Ανάλογα με τον τύπο τυριού, τα περιεχόμενα των βιταμινών μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Παράγοντες που επηρεάζουν την περιεκτικότητα του τυριού σε λίπος, συμπεριλαμβανομένου του τύπου γάλακτος και της μεθόδου παραγωγής, επηρεάζουν επίσης τη συγκέντρωση των λιποδιαλυτών βιταμινών στο τυρί. Οι περισσότερες από τις λιποδιαλυτές βιταμίνες διατηρούνται στο τυρόπηγμα με το λίπος γάλακτος, ενώ η συγκέντρωση των υδατοδιαλυτών βιταμινών είναι γενικά χαμηλότερη λόγω των απωλειών στον ορό γάλακτος. Τα τυριά είναι καλές πηγές βιταμίνης B12, βιταμίνης A, νιασίνης, ριβοφλαβίνης και φολικού οξέος.

Το τυρί περιέχει υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου, η οποία έχει ισοδύναμο βιοδιαθεσιμότητας, λόγω του σχηματισμού συμπλοκών μεταξύ ασβεστίου και πεπτιδίων καζεΐνης που εμποδίζουν την καταβύθιση ασβεστίου στο έντερο (Ebringer et al., 2008). Το χλωριούχο ασβέστιο προστίθεται συχνά στην παραγωγή τυριού για να μειώσει τον χρόνο πήξης της πυτίας, να μειώσει τις ποσότητες πυτίας που απαιτούνται, αυξάνουν τη σταθερότητα της γέλης και αυξάνουν τη συγκέντρωση ασβεστίου (Kruif and Holt, 2006). Η επαρκής πρόσληψη ασβεστίου είναι απαραίτητη. Εάν η πρόσληψη ασβεστίου είναι ανεπαρκής, το σώμα θα αποδυναμώσει τα οστά για να διατηρήσει τα κανονικά επίπεδα ασβεστίου στο αίμα. Σύμφωνα με κυβερνητικές στατιστικές, εννέα από τις 10 γυναίκες και οι έξι στους 10 άνδρες υπολείπονται των συστάσεων για το ασβέστιο. Η οστεοπόρωση είναι μια μικρο-αρχιτεκτονική φθορά του οστού με μια μείωση σε οστικής μάζας και ενώ πολλοί παράγοντες επηρεάζουν την αιτιολογία της οστεοπόρωσης, έχει αποδειχθεί ότι η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έχει επιπτώσεις στην υγεία των οστών σε μεταγενέστερη ζωή. Το ασβέστιο από την κατανάλωση τυριού μπορεί να συμβάλει στη δημιουργία και συντήρηση ισχυρών οστών, στη μείωση της αρτηριακής πίεσης και στην πρόληψη της τερηδόνας (Aimutis, 2004). Το ασβέστιο είναι ένα από τα θρεπτικά συστατικά που είναι πιθανότερο να λείπουν από την αμερικανική διατροφή. Η υψηλής ποιότητας πρωτεΐνη στο τυρί παρέχει στο σώμα βασικές δομικές μονάδες για ισχυρούς μύες.

Η προσθήκη αλατιού στο τυρί έχει σημαντική επίδραση στην ποιότητα του τυριού και έχει κεντρική σημασία για την παραγωγή του. Λειτουργεί ως συντηρητικό,

επηρεάζει τη δομή και γεύση του τυριού επηρεάζοντας τη δράση των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων και επηρεάζει και τη ρεολογία του τυριού. Τα επίπεδα νατρίου στα τυριά ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με τα ποσά που προστίθενται κατά τη διάρκεια του τυροκομείου. Για παράδειγμα, το τυρί κρέμα και το τυρί Cottage περιέχει τις χαμηλότερες ποσότητες νατρίου (300 και 380 mg / 100 g αντίστοιχα), ενώ τα τυριά Roquefort και Feta περιέχουν τις μεγαλύτερες ποσότητες (1.670 και 1.440 mg / 100 g αντίστοιχα) (Zhang et al., 2023).

Η υψηλή πρόσληψη αλατιού και η υπέρταση έχουν συνδεθεί, αλλά αυτό εξακολουθεί να συμβαίνει σε μερικές μελέτες που δεν δείχνουν συσχέτισμο μεταξύ πρόσληψης νατρίου και αρτηριακής πίεσης. Έχει προταθεί ότι η παχυσαρκία, το αλκοόλ, η αδράνεια και η χαμηλή πρόσληψη καλίου έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην αρτηριακή πίεση από ό, τι η υψηλή πρόσληψη αλατιού. Οι κατευθυντήριες γραμμές για το ευρύ κοινό υποδηλώνουν συνήθως ότι η πρόσληψη αλατιού πρέπει να περιοριστεί. Το τυρί συμβάλλει μόνο στο 5-8% της συνολικής πρόσληψης νατρίου, ακόμη και σε χώρες με υψηλή πρόσληψη νατρίου. Επιπλέον, το τυρί είναι μια πλούσια πηγή το ασβέστιο, το οποίο έχει προταθεί ότι μπορεί να μειώσει την αρτηριακή πίεση. Έτσι, παρά τη συγκέντρωση άλατος του τυριού, περιέχει επίσης και άλλα συστατικά που μπορεί να μετριαζουν τις αυξήσεις της αρτηριακής πίεσης (ασβέστιο και BP) (Preedy et al., 2013).

Τα τελευταία 30 χρόνια, τα κορεσμένα λιπαρά που βρέθηκαν στα κρέατα, τα αυγά, το τυρί, το βούτυρο, το πλήρες γάλα, το λαρδί και ορισμένα έλαια θεωρήθηκαν πρωταρχική αιτία των καρδιακών παθήσεων. Ωστόσο, η νέα έρευνα δείχνει ότι τα κορεσμένα λιπαρά έχουν ελάχιστη επίδραση στον κίνδυνο καρδιακών παθήσεων, γεγονός που μεταβάλλει το πρότυπο "κορεσμένο λίπος είναι κακό" και επιτρέπει στους ανθρώπους να απολαμβάνουν περισσότερο τυρί και άλλα αγαπημένα τρόφιμα. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα που να δείχνει σημαντική επιστημονική συμφωνία.

Οι κατευθυντήριες οδηγίες για τους Αμερικανούς για τα διατροφικά συστήνουν ότι άτομα ηλικίας 9 ετών και άνω καταναλώνουν τουλάχιστον 3 μερίδες γάλακτος, τυριού ή γιαούρτι κάθε μέρα. τα παιδιά ηλικίας 4-8 ετών χρειάζονται 2-1 / 2 φλιτζάνια την ημέρα.

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται ενδεικτικά τα διατροφικά στοιχεία της φέτας που αποτελεί και τον κατεξοχήν τύπο τυριού που καταναλώνεται στην Ελλάδα. Να αναφερθεί ότι δεν δίνονται όλα τα διατροφικά στοιχεία μιας και ο πίνακας είναι πολύ μεγάλος. Τα υπόλοιπα στοιχεία που ακολουθούν αφορούν την αναλυτική συγκέντρωση των βιταμινών, των λιπιδίων και λιπαρών οξέων καθώς και των αμινοξέων.

<b>Nutrient</b>	<b>Unit</b>	<b>Value Per100 g</b>
<b>Proximates</b>		
Water	g	55.22
Energy	kcal	265
Energy	kJ	1107
Protein	g	14.21
Total lipid (fat)	g	21.49
Ash	g	5.20
Carbohydrate, by difference	g	3.88
Fiber, total dietary	g	0.0
Sugars, total	g	0.00
<b>Minerals</b>		
Calcium, Ca	mg	493
Iron, Fe	mg	0.65
Magnesium, Mg	mg	19
Phosphorus, P	mg	337
Potassium, K	mg	62
Sodium, Na	mg	1139
Zinc, Zn	mg	2.88
Copper, Cu	mg	0.032
Manganese, Mn	mg	0.028
Selenium, Se	µg	15.0
<b>Vitamins</b>		
Vitamin C, total ascorbic acid	mg	0.0

**Εικόνα 2.** Διατροφικά στοιχεία φέτας (USDA National Nutrient Database for Standard Reference).

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός τυριού είναι το πιο σημαντικό κριτήριο ποιότητας που βασίζεται ο καταναλωτής. Πριν και κατά τη διάρκεια της κατανάλωσης, αυτά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, γενικά που ταξινομούνται ως εμφάνιση, υφή και γεύση, θεωρούνται σημαντικά και προκαλούν συγκεκριμένες

απαντήσεις στους καταναλωτές που καθορίζουν την ενδεχόμενη αποδοχή (ή απόρριψη) ενός συγκεκριμένου τυριού. Η εμφάνιση είναι γενικά το πρώτο αισθητηριακό χαρακτηριστικό που αντιλαμβάνεται ένας καταναλωτής, ο οποίος αξιολογεί οπτικά ένα τυρί με γρήγορο και μη επεμβατικό τρόπο πριν την έναρξη της διαδικασίας φαγητού (Ross, 2009). Η εμφάνιση περιλαμβάνει ορισμένα χαρακτηριστικά, π.χ. χρώμα, ομοιομορφία, παρουσία οφθαλμών (ή οπές) και καλούπια, τύπος δέρματος και οπτική υφή.

Επιπλέον, το μέγεθος, το σχήμα και τα χαρακτηριστικά συσκευασίας αποτελούν επίσης μέρος της εικόνας μάρκετινγκ και έτσι ταξινομούνται ως χαρακτηριστικά εμφάνισης. Κάθε τύπος τυριού έχει συγκεκριμένο χαρακτήρα και ιδιότητες εμφάνισης. για παράδειγμα τα τυριά Gouda, Edam και Emmental παρουσιάζουν μάτια, το Camembert έχει λευκά καλούπια επιφάνειας και το Roquefort περιέχει σκοτεινά εσωτερικά καλούπια. Ως εκ τούτου, οι καταναλωτές αναζητούν σε κάθε ποικιλία τυριών εκείνες τις εμφανείς ιδιότητες που είναι χαρακτηριστικές αυτής και έτσι η απουσία τους συχνά καθορίζει την απόρριψη. Επιπλέον, οι εν λόγω ιδιότητες εμφάνισης δημιουργούν και αισθητικές προσδοκίες (Preedy V., Watson R., Patel V. 2013).

Η υφή του τυριού είναι ένα σύνθετο αισθητήριο χαρακτηριστικό που προκύπτει από ένα συνδυασμό φυσικών ιδιοτήτων όπως το μέγεθος, το σχήμα και ο αριθμός και η διαμόρφωση των δομικών στοιχείων. Η αντίληψη της υφής του τυριού αρχίζει πριν από την κατανάλωση, κοιτάζοντας την επιφάνεια του τυριού και στην κοπή του, και συνεχίζει κατά την κατάποση ως αίσθηση αφής στο στόμα (Ross, 2009). Τα χαρακτηριστικά υφής του τυριού έχουν περιγραφεί κλασικά με τη χρήση τέτοιων όρων όπως η συγκόλληση, συνεκτικότητα, θραυστότητα, σταθερότητα και ελαστικότητα (Delahunty and Drake, 2004).

Το τελευταίο χαρακτηριστικό η γεύση του τυριού απορρέει από την αντίληψη ενός συνδυασμού διαφόρων ενώσεων πτητικών και αρώματος, πριν από την κατανάλωση όταν ο καταναλωτής μυρίζει το τυρί, και κατά την κατανάλωση όταν οι ενώσεις απελευθερώνονται με τη μάσηση και, κατά συνέπεια, διεγείρουν τον οσφρητικό και το αισθητήριο επιθήλιο του στόματος. Πολλές πτητικές ενώσεις έχουν ταυτοποιηθεί σε τυριά, συμπεριλαμβανομένων λιπαρών οξέων, εστέρων, κετονών, αλκοολών, αλδεϋδών, αμινών, αμιδίων, φαινολών και ενώσεων θείου (McSweeney και Sousa,

2000). Από την άλλη πλευρά, η γεύση γίνεται αντιληπτή στην στοματική κοιλότητα, όπου δεν είναι πτητικές οι ενώσεις και οδηγούν σε πέντε χαρακτηριστικές ιδιότητες γλυκιά, αλμυρή, ξινή, πικρή και umami. Ενώσεις όπως χλωριούχο νάτριο και άλλα μεταλλικά άλατα καλίου, ασβεστίου και του μαγνησίου συντελούν στην αλμυρή γεύση τα υδρόφοβα πεπτίδια και ορισμένα αμινοξέα όπως το γλουταμινικό οξύ είναι υπεύθυνα για γεύση umami (Drake et al., 2007). Εκτός από τη μυρωδιά και τη γεύση, μια άλλη πτυχή της γεύσης είναι η χημεία, η οποία αναφέρεται στο αισθητήριο σύστημα που είναι υπεύθυνο για την ανίχνευση χημικών ερεθισμάτων. Πολλοί από τους γνωστούς χημικούς ερεθιστές γίνονται αντιληπτοί διέγερση του νεύρου του τριδύμου που τελειώνει στο στόμα, τη μύτη ή τα μάτια (Lawless and Heymann, 2010). Παραδείγματα αυτού του είδους της αντίληψης στο τυρί είναι η ευκαμψία, το τρύπημα και η ευκρίνεια στο ώριμο τυρί Cheddar.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup> ΤΥΡΙΑ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

Από το 1988, η παγκόσμια παραγωγή γάλακτος έχει αυξηθεί κατά 59% και το 2023 θα φτάσει τους 944 εκατομμύρια τόνους. Το κυριότερο υγρό απόβλητο που παράγεται στα τυροκομεία με υψηλό οργανικό φορτίο είναι το τυρόγαλο ή εναλλακτικά ορός γάλακτος, μιας και προκαλεί πέντε έως δεκαπέντε φορές μεγαλύτερη περιβαλλοντική ρύπανση από τα αστικά απόβλητα. Ο ορός γάλακτος, ανά έτος ανέρχεται πλέον στους 200 εκατομμύρια τόνους. Παρόλο που οι βιομηχανίες τροφίμων και οι φαρμακευτικές βιομηχανίες χρησιμοποιούν το ήμισυ αυτού του ορού γάλακτος, μια αρκετά μεγάλη μερίδα σπαταλάται, γεγονός που δημιουργεί προβλήματα για το περιβάλλον λόγω των υψηλών βιολογικών αναγκών σε οξυγόνο (Mukherjee et al., 2023).

Η ποσότητα του οργανικού φορτίου σε τιμές BOD κυμαίνεται από 30.000 έως 50.000 ppm και σε τιμές COD από 60.000 έως 80.000 ppm (Jelen, 2002). Ομοίως λόγω του υψηλής οργανικής φύσης του τυρογάλακτος στα τυροκομεία προσπαθείτε η απομόνωση του, για την επίτευξη χαμηλότερου οργανικού φορτίου. Η σύσταση των υγρών υπολειμμάτων στις τυροκομικές μονάδες χαρακτηρίζεται από πρωτεΐνες, λακτόζη και λιπαρές ουσίες αλλά και μέταλλα όπως ο φωσφόρος και το ασβέστιο (Μακρής κ.α, 2001).

Σύμφωνα με τον Κανονισμό 625/30-3-1978 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το τυρόγαλο ορίζεται ως το προϊόν που λαμβάνεται μέσω της χρήσης οξέων, πυτιάς και/ή φυσικοχημικών μεθόδων κατά την παραγωγή τυριών και προϊόντων καζεΐνης. Αυτό το προϊόν είναι πιο απλά γνωστό ως ορός του γάλακτος, το κιτρινοπράσινο υγρό που παραμένει μετά την παρασκευή τυριού, όταν το υγρό διαχωρίζεται από το τυρόπηγμα.

Η Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) καθορίζει τον ορό του γάλακτος ή τυρόγαλο ως το ρευστό γαλακτοκομικό προϊόν που λαμβάνεται κατά τη διάρκεια της παρασκευής των τυριών, της καζεΐνης ή παρόμοιων προϊόντων από το τυρόπηγμα μετά την πήξη του γάλακτος. Η πήξη επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της δράσης ενζύμων τύπου πυτιάς.

Το 40% της παγκόσμιας παραγωγής ορού γάλακτος βρίσκεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ το υπόλοιπο παράγεται στην Κίνα (9%), τον Καναδά (4%), την Αυστραλία (3%) και τις Ηνωμένες Πολιτείες πολιτειών (31%). Η Ασία-Ειρηνικός, η Ευρώπη, η

Βόρεια Αμερική και ο υπόλοιπος κόσμος αποτελούν τα τέσσερα τμήματα της αγοράς ορού γάλακτος με τις κορυφαίες αγορές να βρίσκονται στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη. Η Κίνα, οι Ηνωμένες Πολιτείες, ο Καναδάς, η Γερμανία και το Ηνωμένο Βασίλειο είναι οι κορυφαίοι εισαγωγείς ορού γάλακτος. Η Βραζιλία εισήγαγε 39 εκατομμύρια δολάρια ΗΠΑ και εξήγαγε ορό γάλακτος αξίας 8145 εκατομμύρια δολάρια. Κάθε χρόνο, στην Ευρωπαϊκή Ένωση παράγονται 4,03 εκατομμύρια τόνοι ορού γάλακτος, εκ των οποίων οι 557.000 τόνοι εξάγονται. Με 158.212 τόνους, η Κίνα είναι η χώρα με το μεγαλύτερο ποσοστό εισαγωγών από την Ε.Ε (Ramos et al., 2021).

### **2.1. Μέθοδοι παρασκευής τυρογάλακτος**

Ο ορός γάλακτος λαμβάνεται μετά την αφαίρεση της καζεΐνης από το γάλα. Η καζεΐνη μπορεί να διαχωριστεί από το γάλα με σταδιακή πτώση σε pH 4,6, με χρήση ενζύμων πρωτεόλυσης ή με μικροδιήθηση. Η οξίνιση του γάλακτος μπορεί να προκληθεί από μικροβιακή ζύμωση λακτόζης σε γαλακτικό οξύ ή με την προσθήκη οργανικών οξέων (κιτρικού οξέος ή γαλακτικού οξέ) ή ανόργανων οξέων (θειικό οξύ, φωσφορικό οξύ, υδροχλωρικό οξύ).

Υπάρχουν δύο τύποι ορού, ο γλυκός και ο ξινός. Ο γλυκός ορός γάλακτος παράγεται όταν το γάλα πήζει με πυτιά σε pH 6,0–6,5 κατά την παραγωγή τυριού ή καζεΐνης. Συνήθως, η διαδικασία παρασκευής σκληρών και ημίσκληρων τυριών, όπως το τυρί τσένταρ, αποδίδει γλυκό ορό γάλακτος. Ο όξινο ορός γάλακτος παράγεται όταν το γάλα οξινίζεται απευθείας κατά τη σύνθεση καζεΐνης και καζεϊνικών ενώσεων, καθώς και κατά τη διαδικασία ζύμωσης φρέσκων τυριών με πήξη οξέος όπως το τυρί Cottage. Το pH του ορού γάλακτος που προκύπτει είναι μεταξύ 4,6 και 5,0. Σε σύγκριση με τη σκόνη γλυκού ορού γάλακτος (1–1,5%), η όξινη σκόνη ορού γάλακτος έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά (0,5–1%). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης είναι η ίδια τόσο στον γλυκό όσο και στον όξινο ορό γάλακτος (11-13,5%), ωστόσο ο γλυκός ορός γάλακτος έχει υψηλότερο επίπεδο λακτόζης (63-75%) (Khezri et al., 2016).

## 2.2. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τυρογάλακτος

Ο ορός γάλακτος, συμπεριλαμβανομένων τόσο του γλυκού όσο και του όξινου είναι κυρίως νερό, αποτελώντας περίπου το 93-95%. Το τυρόγαλα διατηρεί περίπου 55% της αρχικής περιεκτικότητάς του γάλακτος σε πρώτες ύλες, περίπου 4,5-5% w/v λακτόζη, 0,6-0,8% w/v πρωτεΐνες, περίπου 8-10% w/w ανόργανα άλατα και περίπου 0,4-0,5% w/v λίπη και έλαια. Επιπλέον, ο ορός γάλακτος περιέχει απαραίτητα μέταλλα, βιταμίνες του συμπλέγματος Β και άλλες δευτερεύουσες ενώσεις. Η πήξη της καζεΐνης γίνεται με δύο τρόπους: με τη χρήση ενζύμων ή με την παρουσία βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB, Lactic Acid Bacteria). Όταν προκαλείται από τα ένζυμα, το τυρόγαλα ονομάζεται γλυκός ορός γάλακτος, ενώ όταν γίνεται με την παρουσία LAB, ονομάζεται όξινος ορός γάλακτος (Pescuma, et al., 2010). Στον ακόλουθο Πίνακα δίνεται η σύσταση του τυρογάλακτος που προέκυψε από την Παρασκευή διαφορετικών ελληνικών τυριών.

**Πίνακας 1.** Σύσταση Τυρογάλακτος από την παραγωγή διάφορων ελληνικών τυριών (Κουρέτας, 2007)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ (%)	ΑΠΟ ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ ΓΑΛΑ				ΑΠΟ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΑ		
	(Φ)	(Τ)	(Γ)	(Κ)	(Φ)	(Γ)	(Κ)
Στερεά Συστατικά	6,32	6,69	6,9	6,55	7,87	8,74	8,1
Υγρασία	93,68	93,31	93,1	93,45	92,12	91,26	92,1
Λίπος	0,25	0,4	0,6	0,4	0,39	1,26	0,8
Ολική Πρωτεΐνη	0,82	0,85	0,9	0,8	1,61	1,52	1,55
Λακτόζη	4,72	4,9	4,9	4,85	5,33	5,27	5,25
Τέφρα	0,49	0,52	0,5	0,5	0,66	0,5	0,5
Οξύτητα (% γαλακτικού οξέος)	0,125	0,115	0,12	0,11	0,14	0,14	0,14
pH	6,63	6,5	6,3	6,4	6,4	6,3	6,2

Όπου (φ) φέτα, (Τ) τελεμές, (Γ) γραβιέρα, (Κ) κασέρι.

Γνωστός κυρίως για την υψηλή περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες, ο ορός γάλακτος περιέχει διάφορες πρωτεΐνες ορού γάλακτος όπως β-λακτοσφαιρίνη και α-λακταλβουμίνη, μαζί με ανοσοσφαιρίνες. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μπορεί να ποικίλλει, τυπικά κυμαίνεται από 0,6% έως 1,8% στον ορό γάλακτος τυριού, με

υψηλότερες συγκεντρώσεις στα συμπυκνώματα και τα απομονωμένα προϊόντα πρωτεΐνης ορού γάλακτος. Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι από τις πιο πλούσιες διαθέσιμες πρωτεΐνες και έχουν υψηλότερη θρεπτική αξία από την καζεΐνη. Ο ορός γάλακτος έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και περιλαμβάνει σημαντικά αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη και η μεθειονίνη, καθώς και αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας όπως η ισολευκίνη, η λευκίνη και η βαλίνη. Σε σύγκριση με τον αγελαδινό ορό γάλακτος, ο ορός γάλακτος προβάτου έχει υψηλότερες ποσότητες β-λακτοσφαιρίνης, σχεδόν την ίδια ποσότητα α-λακταλβουμίνης και χαμηλότερες ποσότητες λευκωματίνης ορού και ανοσοσφαιρινών. Σε σύγκριση με τον αγελαδινό ορό γάλακτος, ο κατσικίσιος ορός γάλακτος έχει χαμηλότερες ποσότητες ανοσοσφαιρινών, λευκωματίνης ορού και β-λακτοσφαιρίνης και διπλάσια ποσότητα α-λακταλβουμίνης (Moatsou et al., 2005).

Η λακτόζη, ένα σάκχαρο γάλακτος, είναι επίσης ένα σημαντικό συστατικό του ορού γάλακτος, που περιλαμβάνει περίπου 4,5% έως 5% στον ορό γάλακτος. Ωστόσο, τα συμπυκνώματα και τα προϊόντα απομόνωσης πρωτεΐνης ορού γάλακτος υποβάλλονται σε περαιτέρω επεξεργασία για τη μείωση της περιεκτικότητας σε λακτόζη. Ο ορός γάλακτος χρησιμεύει επίσης ως πηγή βασικών μετάλλων όπως το ασβέστιο, ο φώσφορος, το κάλιο και το μαγνήσιο, αν και οι συγκεντρώσεις τους μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με την αρχική πηγή γάλακτος και τις συνθήκες επεξεργασίας (Rocha & Guerra, 2020).

Όσον αφορά τις φυσικές του ιδιότητες, ο ορός γάλακτος εμφανίζει γενικά ένα εύρος pH από 6,1 έως 6,6, επηρεάζοντας τη διαλυτότητά του και τις αλληλεπιδράσεις του με άλλες ουσίες. Ο φρέσκος ορός γάλακτος έχει συνήθως ανοιχτό κίτρινο και ημιδιαφανές χρώμα, αν και η εμφάνισή του μπορεί να αλλοιωθεί με τεχνικές επεξεργασίας ή την προσθήκη ουσιών όπως αρωματικές ύλες ή σταθεροποιητές. Ο ορός γάλακτος έχει σχετικά χαμηλό ιξώδες σε σύγκριση με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, το οποίο μπορεί να αλλάξει με τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης και της θερμοκρασίας κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση.

Γενικά υπάρχει ποικιλομορφία στη χημική σύνθεση του ορού γάλακτος, η οποία ποικίλλει ανάλογα με το είδος τυριού που παράγεται ως το κύριο προϊόν τυροκομίας και τον τύπο γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του πρωτογενούς τυριού. Επιπλέον, οι εποχικές διακυμάνσεις που προκαλούνται από τη γαλουχία ή

άλλους παράγοντες, καθώς και οι παραλλαγές της διατροφής, συμβάλλουν επίσης στις παρατηρούμενες αποκλίσεις. Σε σύγκριση με τον αγελαδινό ορό γάλακτος, ο πρόβειος ορός γάλακτος έχει πολύ μεγαλύτερες ποσότητες ολικών στερεών, λιπιδίων και πρωτεϊνών λόγω της σύνθεσης του πρόβειου γάλακτος (Pintado et al., 2001).

Η σύνθεση βέβαια διαφόρων τύπων ορού γάλακτος μπορεί να παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις λόγω και πολλών παραγόντων που οφείλονται στις μεθόδους παραγωγής, συμπεριλαμβανομένης της προεπεξεργασίας του γάλακτος τυριού (θέρμανση, φυγοκέντρηση, χρησιμοποιούμενες καλλιέργειες, μηχανικός χειρισμός, χρήση βοηθημάτων επεξεργασίας όπως το κίτρινο χρώμα, χρήση διεργασιών μεμβράνης). και τις διαδικασίες χειρισμού και προεπεξεργασίας ορού γάλακτος (παστερίωση, προσυμπύκνωση, ανάκτηση λεπτών λεπτών καζεΐνης).

### **2.3. Διατροφικά στοιχεία**

Πολυάριθμες μελέτες έχουν τεκμηριώσει εκτενώς τη θρεπτική αξία του τυρογάλακτος. Οι Lorieau et al έχουν επισημάνει ότι το τυρί ορού γάλακτος παρουσιάζει ξεχωριστές ιδιότητες πέψης και απορρόφησης σε σύγκριση με το τυρί που έχει πήξει με πυτιά. Συγκεκριμένα, βρήκαν υψηλότερη βιοδιαθεσιμότητα αμινοξέων στο τυρί ορού γάλακτος και κυρίως απαραίτητων αμινοξέων, τα οποία είναι ευεργετικά για τη μυϊκή σύνθεση, ιδιαίτερα σε ηλικιωμένα άτομα. Ειδικότερα, το υψηλότερο επίπεδο λευκίνης που ανιχνεύθηκε στο πλάσμα μετά την κατανάλωση του τυριού με βάση τον ορό γάλακτος ήταν διπλάσιο από αυτό που βρέθηκε μετά την κατανάλωση μοτσαρέλας. Επιπλέον, η φάση πλατώ που σημειώθηκε και στις δύο περιπτώσεις επιτεύχθηκε δύο ώρες μετά την κατανάλωση του γεύματος. Τέλος, το τυρί με βάση τον ορό γάλακτος είχε σημαντικά μεγαλύτερες περιοχές κάτω από τις καμπύλες για λευκίνη, λυσίνη, ασπαραγίνη και ισολευκίνη μεταξύ 0 και 7 ωρών πέψης σε σχέση με το τυρί μοτσαρέλα (Lorieau et al., 2018).

Πέρα από το διατροφικό της προφίλ, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος αναγνωρίζονται για τις διάφορες ιδιότητες που προάγουν την υγεία. Έχει αποδειχθεί ότι ενισχύουν την ανοσία, δυνητικά αναστέλλουν τον HIV και ασκούν αντικαρκινικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου. Περιέχουν βιοενεργά πεπτιδία όπως λακτοφερίνη, ανοσοσφαιρίνες και γλυκομακροπεπτιδία, τα οποία μπορούν να

βοηθήσουν στην υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού έναντι λοιμώξεων και προάγοντας την εύρυθμη λειτουργία του ανοσοποιητικού. Επίσης, τα συστατικά όπως η λακτοφερίνη και άλλα βιοενεργά πεπτίδια στον ορό γάλακτος έχουν διερευνηθεί για την ικανότητά τους να αναστέλλουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και να προκαλούν απόπτωση σε κακοήγη κύτταρα (Rocha-Mendoza et al., 2021).

Τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, τα οποία είναι κρίσιμα για τη διατήρηση της μυϊκής υγείας καθώς δρουν ως μεταβολικοί ρυθμιστές για την ομοίωση των πρωτεϊνών και της γλυκόζης και τον μεταβολισμό των λιπιδίων (ρύθμιση βάρους), είναι επίσης άφθονα στις πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Επιπλέον, περιλαμβάνουν αμινοξέα που περιέχουν θείο, τα οποία ελέγχουν το μεταβολισμό και χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία για τη γλουταθειόνη, ένα ισχυρό ενδοκυτταρικό αντιοξειδωτικό αποτελούν ένα σημαντικό κλάσμα των πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στα αυγά, το βόειο κρέας και τη σόγια, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος προσφέρουν επίσης μια ανώτερη ποσότητα απαραίτητων (Pires et al., 2021).

Επιπλέον, το τυρί ορού γάλακτος είναι ευεργετικό για την υγεία του εντέρου. Περιέχει βακτήρια που ζυμώνουν λακτόζη που συμβάλλουν σε μια υγιή μικροχλωρίδα του εντέρου, προάγοντας την υγεία του πεπτικού συστήματος και πιθανώς μειώνοντας τον κίνδυνο γαστρεντερικών διαταραχών. Η διαδικασία ζύμωσης που εμπλέκεται στην παραγωγή τυριού ενισχύει επίσης τη βιοδιαθεσιμότητα ορισμένων θρεπτικών συστατικών και βιοδραστικών ενώσεων, ενισχύοντας περαιτέρω το διατροφικό του προφίλ (Solak & Akin, 2012).

Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος ένα πολύτιμο διατροφικό συστατικό με επιπτώσεις τόσο στη διατροφική υγεία όσο και σε θεραπευτικές εφαρμογές. Οι μελέτες που αναφέρονται παρέχουν ισχυρά στοιχεία που υποστηρίζουν αυτά τα οφέλη για την υγεία, υπογραμμίζοντας περαιτέρω τη σημασία των προϊόντων που προέρχονται από ορό γάλακτος στην προώθηση της συνολικής ευημερίας.

## 2.4. Προϊόντα τυρογάλακτος

Ο ορός γάλακτος χρησιμοποιήθηκε ως επί το πλείστον ως ζωοτροφή ή λίπασμα πριν από το 1970 και θεωρήθηκε ως απόβλητο στην επιχείρηση τυριών. Αλλά η εφαρμογή αυστηρών περιβαλλοντικών νόμων οδήγησε σε μια μετατόπιση της κοινής γνώμης σε άλλες εφαρμογές που είναι πιο βιώσιμες. Η βιοαύξηση είναι μια βιώσιμη προσέγγιση που χρησιμοποιείται για την κατεργασία του ορού γάλακτος για βιοαποκατάσταση. Η διεργασία αυτή περιλαμβάνει την εισαγωγή συγκεκριμένων μικροοργανισμών που ενισχύουν τη διάσπαση των οργανικών ενώσεων στον ορό γάλακτος. Συμπληρώνοντας τη φυσική μικροβιακή κοινότητα, η βιοαύξηση επιταχύνεται τη συνολική διαδικασία βιοαποκατάστασης και βελτιώνεται την απομάκρυνση ρύπων ώστε να μειωθεί η περιβαλλοντική επίπτωση (Soumati et al., 2023).

Η δημιουργία αφυδατωμένων προϊόντων ορού γάλακτος, όπως απομονώσεις πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPI, Whey Protein Isolates), συμπυκνώματα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC, Whey Protein Concentrated) και λακτόζη σε σκόνη, είναι μια από τις παραδοσιακές μεθόδους για τη διαχείριση του ορού γάλακτος. Λόγω των φυσικοχημικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών τους, που τους επιτρέπουν να λειτουργούν ως γαλακτωματοποιητές, πηκτωματοποιητές και παράγοντες αφρισμού σε συστήματα τροφίμων, οι απομονωμένες πρωτεΐνες ορού γάλακτος χρησιμοποιούνται επίσης στις επιχειρήσεις τροφίμων. Χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα πιάτων, όπως σάλτσες για σαλάτες, σούπες, επεξεργασμένα κρέατα, γαλακτοκομικά, αρτοσκευάσματα και συγκεκριμένα προϊόντα ορού γάλακτος όπως η Ricotta ή άλλα τυριά ορού γάλακτος. Επίσης, κυκλοφορούν στο εμπόριο ως συμπληρώματα διατροφής (Pires et al., 2021).

Ο ορός γάλακτος πλέον χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός ευρέος φάσματος προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων τυριών ορού γάλακτος, σκόνης ορού γάλακτος, βρώσιμων μεμβρανών, ποτών, συμπληρωμάτων ζωοτροφών και παραγωγής βιοαερίου, τα οποία βασίζονται όλα στις έννοιες της κυκλικής οικονομίας. Λόγω των συστατικών του ορού γάλακτος και των λειτουργικών τους ιδιοτήτων, έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμο προϊόν. Ως αποτέλεσμα, έχουν δημιουργηθεί εφαρμογές που σχετίζονται με τα τρόφιμα που χρησιμοποιούν συστατικά ορού γάλακτος και κυρίως πρωτεΐνες (Bintsis και Papademas, 2023).

Τα ποτά που παρασκευάζονται με ορό γάλακτος έχουν βιώσει μια τρομερή μεταμόρφωση. Λόγω του θρεπτικού τους περιεχομένου και της ικανότητάς τους να προσαρμόζονται στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις και γεύσεις των πελατών, αυτά τα ποτά γίνονται όλο και πιο δημοφιλή. Παρέχουν μια ευρεία ποικιλία εναλλακτικών λύσεων, όπως smoothies φρούτων, ροφήματα πρωτεΐνης, αθλητικά ποτά και ανθρακούχα ποτά, δίνοντας στους πελάτες μια ελκυστική και ποικίλη επιλογή (Chavan et al., 2015).

Υπάρχουν αρκετά τυριά ορού γάλακτος που παρασκευάστηκαν αρχικά από τα υποπροϊόντα του πρόβειου ή κατσικίσιου ορού γάλακτος. Τα γαλακτοκομεία στη σύγχρονη εποχή, παρασκευάζουν τυρί ορού γάλακτος από αγελαδινό ορό γάλακτος ή προσθέτουν αγελαδινό γάλα λόγω της αυξημένης ζήτησης από το καταναωτικό κοινό ανα τον κόσμο. (Robinson, & Wilbey, 1998).

Σε αντίθεση με τα παραδοσιακά τυριά, τα οποία παρασκευάζονται από τυρόπηγμα, τα τυριά ορού γάλακτος χρησιμοποιούν τις πρωτεΐνες που παραμένουν στον ορό γάλακτος, με αποτέλεσμα τα παραγόμενα τυροκομικά να χαρακτηρίζονται από ξεχωριστές και σπάνιες σε πληθώρα περιπτώσεων υφές και γεύσεις. Σήμερα, τα τυριά ορού γάλακτος παρασκευάζονται σε όλο τον κόσμο με διάφορα ονόματα, όπως Ricotta, Ricotta salata, μερικές φορές γνωστά ως Riccottonne, και Ricotta fresca στην Ιταλία. Στην Ελλάδα υπάρχουν τα κάτωθι τυριά της συγκεκριμένης κατηγορίας όπως ο Ανθότυρος, η Μυζήθρα, το Μανούρι, η Ξυνομυζήθρα και η Ούρδα, Lor στην Τουρκία, Ανάρη στην Κύπρο, Skuta στην Κροατία και τη Σερβία, Gjetost και Brunost στη Νορβηγία, Mesost και Messmör στη Σουηδία, Requeijão στην Πορτογαλία (Bintsis και Parademas, 2023). Στον ακόλουθο Πίνακα δίνονται τα κυριότερα τυριά που παράγονται από τυρόγαλα ανά περιοχή.

**Πίνακας 2:** Τυριά τυρογάλακτος που παράγονται σε διάφορες χώρες (Pintado et al., 2001).

ΧΩΡΑ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΥΡΙΟΥ ΤΥΡΟΓΑΛΑΚΤΟΣ
Νορβηγία	Mysost, Primost, Gjestost
Ελβετία	Schottenziegr, Hudelziger
Πορτογαλία	Requeijao
Ισπανία	Requeson
Γαλλία	Serac, Brousse, Broccio, Greuil
Ελλάδα	Μανούρι, Ανθότυρος, Μυζήθρα
Ιταλία	Ricotta



Μάλτα	Casio-Ricotta
Κύπρος	Anari
Ρουμανία	Ziger,Urda
Ρωσία	Nadigi, Kaukaz
Ισραήλ	Urda
Αργεντινή	Ricotta
Βραζιλία	Requeijao do Norte
Η.Π.Α	Ricotta, Ricotone

Από τα διάφορα τυριά ορού γάλακτος, τα Requeijão da Beira Baixa και Requeijão Serra da Estrela στην Πορτογαλία, Μανούρι και Ξινομυζήθρα Κρήτης στην Ελλάδα, Brocciu corse στη Γαλλία και Ricotta di Bufala Campana και Ricotta Romana στην Ιταλία έχουν όλα χαρακτηριστεί ως ΠΟΠ (Προστατευόμενη Ονομασία Πορέλευσης). Παρακάτω δίνονται τα κυριότερα ΠΟΠ τυριά τυρογάλακτος και τα χαρακτηριστικά τους. Στην περίπτωση των Ελληνικών τυριών θα αναφερθούν όλες οι κατηγορίες και εκτός των ΠΟΠ.

## 2.5. Ιταλικά τυριά τυρογάλακτος

### 2.5.1. Ricotta

Ένα από τα πιο γνωστά τυριά ορού γάλακτος είναι η ρικότα, με καταγωγή από την Ιταλία. Το Ricotta είναι ένα φρέσκο, μαλακό τυρί με κρεμώδη, ελαφρώς κοκκώδη υφή και ήπια, ελαφρώς γλυκιά γεύση με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία που κυμαίνεται μεταξύ 65 και 75%. Παραδοσιακά, το κύριο συστατικό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριού ricotta είναι ο ορός γάλακτος που συλλέγεται κατά την παραγωγή τυριού μοτσαρέλα. Είναι απίστευτα ευέλικτο και χρησιμοποιείται τόσο σε αλμυρά όσο και σε γλυκά πιάτα, όπως λαζάνια, κανόλι και ως γέμιση για ραβιόλια.

Παρασκευάζεται ως επί το πλείστον χρησιμοποιώντας ορό γάλακτος από πρόβατα ή κασίκες, ή συνδυασμό των δύο ενώ μπορεί επίσης να παρασκευαστεί με ορό γάλακτος από αγελάδες και βουβάλια (Mucchetti and Neviani, 2006). Συγκεκριμένα, η διαδικασία παραγωγής περιλαμβάνει συνήθως βρασμό ορού γάλακτος και προσθήκη οξέος στο θερμαινόμενο μείγμα προκειμένου να προκληθεί η πήξη των πρωτεϊνών ορού γάλακτος. Για την αποστράγγιση του ορού γάλακτος, η

συγκεντρωμένη μάζα τυροπήγματος που ανεβαίνει στην κορυφή συγκεντρώνεται και τοποθετείται σε διάτρητα καλάθια. Για να ενθαρρυνθεί η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος, μπορούν να προστεθούν οξινιστικά (όπως γαλακτικό ή κιτρικό οξύ) σε μείγματα ρικότα σε ποσοστό 1,5 έως 2,5%. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ορός γάλακτος μπορεί να συμπληρωθεί κατά την παραγωγή με πλήρες γάλα ή κρέμα (5–15%) και αλάτι (0,5–1,5%) προκειμένου να αυξηθεί η τελική παραγωγή (Mancuso et al., 2014). Μετά από αυτό, το τζελ ορού γάλακτος που έχει αναπτυχθεί μαζεύεται σε καλούπια για να αφαιρεθεί ο χρησιμοποιημένος ορός γάλακτος (scotta) και να κρυσώσει.

Η παραγωγή τυριού Ricotta μπορεί να είναι βιοτεχνική ή βιομηχανική: οι βασικές μεθοδολογίες παραγωγής είναι κοινές και για τα δύο, με ορισμένες διαφορές στη διαδικασία παρασκευής και στην επεξεργασία μετά την επεξεργασία, που εξασφαλίζουν διαφορετική διάρκεια ζωής. Η σύγχρονη βιοτεχνική παραγωγή τυριού ricotta συνδέεται με μικρές, παραδοσιακές φάρμες που παράγουν μέτριες ποσότητες τυριού υψηλής ποιότητας, διατηρώντας παράλληλα στενή σύνδεση με τις περιοχές παραγωγής μέσω της χρήσης φυσικών συστατικών και παραδοσιακών μεθόδων. Η βιβλιογραφία αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση στην παραγωγή τυριού ρικότα, ιδιαίτερα στα παραδοσιακά συστήματα, ως αποτέλεσμα της χρήσης διαφόρων πρώτων υλών που διαφέρουν ανάλογα με τις τοπικές και περιφερειακές χρήσεις και έθιμα. Η μόνη εξαίρεση είναι η ricotta ΠΟΠ, η οποία τηρεί μια προδιαγραφή παραγωγής που έχει εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή (Mangione et al., 2023).

Η βιβλιογραφία για τη βιομηχανική παραγωγή τυριού ρικότα αποκάλυψε έναν αριθμό παραλλαγών στα στάδια της διαδικασίας, καθώς και στις θερμοκρασίες και τις διάρκειες των διαφόρων σταδίων και στα ποσοστά των διαφόρων συστατικών που χρησιμοποιούνται. Οι όγκοι παραγωγής μεγάλης κλίμακας, και η ομοιογένεια προϊόντων και διεργασιών συνδέονται συνήθως με αυτόν τον τύπο παραγωγής. Ο ορός γάλακτος που χρησιμοποιείται για την παρασκευή βιομηχανικού τυριού ρικότα λαμβάνεται συχνά από παστεριωμένο γάλα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή βιομηχανικού τυριού (Mucchetti et al., 2017).

Το τυρί Ricotta έχει υψηλό επίπεδο υγρασίας (62-78%), υψηλό επίπεδο λιπαρών (6-22%), καλή ποσότητα πρωτεΐνης (6-9%), με χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι (1%). εκτός από τον αλατισμένο τύπο. Ποικίλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη

φυσικοχημική σύνθεση και την τελική ποιότητα του τυριού, συμπεριλαμβανομένου του τύπου των πρώτων υλών (π.χ. γάλα, ορού γάλακτος), την εποχή παραγωγής, τα είδη και τις φυλές των ζώων και τη ζωοτροφή (Bellassi et al., 2021).

Το αγελαδινό γάλα είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο και συνήθως αποδίδει τυρί με ήπια γεύση, χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά και ελαφρώς υψηλότερη υγρασία σε σύγκριση με το πρόβειο ή βουβαλίσιο γάλα. Το πρόβειο γάλα και το βουβαλίσιο γάλα παράγουν Ricotta με πιο πλούσια, πιο κρεμώδη υφή και υψηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά, οδηγώντας σε μια πιο απολαυστική αίσθηση στο στόμα. Η Ricotta από κατσικίσιο γάλα έχει μια ξεχωριστή, πιο μαύρη γεύση και διαφορετικά προφίλ λιπαρών και πρωτεϊνών. Οι εγγενείς διαφορές στην περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνες και λακτόζη μεταξύ αυτών των τύπων γάλακτος επηρεάζουν άμεσα την υφή, τη γεύση και τη θρεπτική αξία του τυριού που προκύπτει (Ortiz Araque et al., 2017).

Η σύνθεση του ορού γάλακτος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για τον προσδιορισμό της ποιότητας του τυριού. Ο ορός γάλακτος διατηρεί σημαντικές ποσότητες διαλυτών πρωτεϊνών όπως η βήτα-λακτοσφαιρίνη και η άλφα-λακταλβουμίνη, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του τυροπήγματος. Η περιεκτικότητα σε υπολειμματικό λίπος στον ορό γάλακτος μπορεί επίσης να επηρεάσει την κρεμώδη υφή της. Επιπλέον, το αρχικό μικροβιολογικό φορτίο του ορού γάλακτος επηρεάζει την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής του τυριού. Ο ορός γάλακτος που προέρχεται από γάλα υψηλής ποιότητας με σωστό χειρισμό εξασφαλίζει ένα καλύτερο φυσικοχημικό προφίλ του τυριού ricotta (Bennato et al., 2022).

Κατά τη διάρκεια της παρασκευής η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας. Εάν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή, η πήξη της πρωτεΐνης μπορεί να είναι ανεπαρκής, οδηγώντας σε χαμηλότερη απόδοση και πιο απαλή υφή. Αντίθετα, οι υπερβολικά υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να προκαλέσουν υπερπήξη, με αποτέλεσμα μια κοκκώδη ή ελαστική υφή. Ο ακριβής έλεγχος της θερμικής επεξεργασίας εξασφαλίζει την επιθυμητή υφή και συνοχή του τυριού (Mangione et al., 2023). Ο τύπος και η ποσότητα του οξέος που θα προστεθεί επηρεάζουν το τελικό pH και τη γεύση του τυριού. Μια υψηλότερη συγκέντρωση οξέος μπορεί να οδηγήσει σε μια πιο έντονη πικάντικη γεύση και πιο σφιχτό τυρόπηγμα, ενώ χαμηλότερα

επίπεδα οξέος μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μια πιο ήπια γεύση και πιο απαλή υφή. Ο χρόνος προσθήκης οξέος κατά τη θέρμανση επηρεάζει επίσης τον σχηματισμό του τυροπήγματος και τη συνολική υφή. Τέλος, η διάρκεια και η μέθοδος αποστράγγισης επηρεάζουν την ποσότητα ορού γάλακτος που αφαιρείται από το τυρόπηγμα. Μεγαλύτεροι χρόνοι στράγγισης ή πιο αποτελεσματικές μέθοδοι στράγγισης έχουν ως αποτέλεσμα ένα πιο στεγνό, πιο σφιχτό τυρί, ενώ οι μικρότεροι χρόνοι στράγγισης δίνουν μια πιο υγρή, πιο κρεμώδη Ricotta. Η ισορροπία της υγρασίας είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη της επιθυμητής συνοχής και δυνατότητας επάλειψης του τυριού (Souza et al., 2016).

## **2.6. Ελληνικά τυριά τυρογάλακτος**

Στην Ελλάδα, ο Ανθότυρος είναι ένα άλλο τυρί ορού γάλακτος που μπορεί να είναι είτε φρέσκο είτε αποξηραμένο. Ο φρέσκος Ανθότυρος είναι μαλακός και ήπιος, ενώ ο αποξηραμένος είναι σκληρός και αλμυρός. Ο φρέσκος Ανθότυρος χρησιμοποιείται σε σαλάτες και αλείμματα, ενώ η αποξηραμένη εκδοχή του τρίβεται συχνά πάνω από τα πιάτα. Δύο ακόμη δημοφιλή τυριά ορού γάλακτος είναι η Μυζήθρα και το Μανούρι. Η Μυζήθρα μπορεί να είναι είτε φρέσκια (μαλακή) είτε παλαιωμένη (σκληρή). Η φρέσκια Μυζήθρα είναι κρεμώδης και ήπια, ενώ η παλαιωμένη μυζήθρα γίνεται σκληρή και αλμυρή. Η φρέσκια Μυζήθρα χρησιμοποιείται συχνά σε αρτοσκευάσματα και ως επιτραπέζιο τυρί, ενώ η παλαιωμένη εκδοχή τρίβεται πάνω από ζυμαρικά ή σαλάτες. Το Μανούρι, από την άλλη, είναι ένα ημίμαλακο τυρί με λεία, κρεμώδη υφή και ήπια, πικάντικη γεύση. Χρησιμοποιείται συχνά σε σαλάτες, αρτοσκευάσματα ή ως επιδόρπιο τυρί σε συνδυασμό με μέλι και φρούτα. Ακολουθώς δίνονται περισσότερες πληροφορίες για τους τρόπους παρασκευής και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των τυριών.

### **2.6.1. Ανθότυρος**

Ο φρέσκος ανθότυρος είναι ένα μαλακό και κρεμώδες τυρί, παρόμοιο με τη Μυζήθρα στην όψη και την υφή, αλλά διαφέρει στη γεύση του. Αρχικά φτιάχτηκε στην Κρήτη, ο ανθότυρος παράγεται πλέον σε όλη την Ελλάδα. Λόγω του τρόπου με τον οποίο σχηματίζονται στην επιφάνεια τα μικροσκοπικά σωματίδια

μετουσιωμένων πρωτεϊνών ορού γάλακτος κατά τη διαδικασία τυροκομίας, ο όρος «Ανθότυρος», προέρχεται από τη λέξη «άνθος», που σημαίνει «άνθος» (Parademas & Bintsis, 2017).

Έχει σχήμα σφαιρικού κώνου, με λευκό έως υπόλευκο χρώμα και συμπαγή υφή χωρίς οπές. Παρασκευάζεται παρόμοια με το ιταλικό τυρί ρικότα και περιέχει σχετικά χαμηλά ποσοστά λιπαρών. Σύμφωνα με μια έρευνα τα δείγματα του εμπορίου έχουν μέσες τιμές χοληστερόλης 56,2 mg/100 g τυριού, κορεσμένων λιπαρών οξέων 10,7 g/100 g, μονοακόρεστων λιπαρών οξέων 3,2 g/100 g, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων 0,63 g/100 g και ενέργειας 100 g. Συνήθως καταναλώνεται ως επιτραπέζιο τυρί, φρέσκο και απευθείας (Andrikopoulos et al., 2003).

Ο ανθότυρος είναι ένα παραδοσιακό ελληνικό τυρί ΠΟΠ (προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης). Η παραγωγή του περιλαμβάνει την προσθήκη αιγοπρόβειου γάλακτος ή κρέμας γάλακτος σε τυρόγαλα πρόβειο ή κατσικίσιο. Ο φρέσκος Ανθότυρος έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, συνήθως γύρω στο 60-70%, καθιστώντας τον απαλό και κρεμώδες, παρόμοιο με τη Ricotta ή το τυρί Cottage. Έχει μέτρια περιεκτικότητα σε λίπος περίπου 15-25% του συνολικού βάρους του και περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη περίπου 15-20%. Το επίπεδο pH του φρέσκου Ανθότυρου είναι ελαφρώς όξινο, κυμαίνεται από 4,5 έως 5,5, συμβάλλοντας στην ήπια, ελαφρώς πικάντικη γεύση και τη φρέσκια γαλακτοκομική γεύση του. Το χρώμα του είναι λευκό έως υπόλευκο και η υφή του απαλή και κρεμώδης (<https://www.greece.org>).

Από την άλλη, ο ημίσκληρος Ανθότυρος έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε υγρασία, γύρω στο 30-40%, με αποτέλεσμα μια πιο σφιχτή αλλά εύθρυπτη υφή που μπορεί να τριφτεί ή να κοπεί σε φέτες. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά στον ημίσκληρο Ανθότυρο είναι μεγαλύτερη, γύρω στο 25-30%, λόγω της μειωμένης περιεκτικότητας σε υγρασία. Έχει επίσης περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη γύρω στο 20-25%. Το επίπεδο pH παραμένει ελαφρώς όξινο, παρόμοιο με τη φρέσκια ποικιλία, αλλά μπορεί να ποικίλλει ελαφρώς με τη γήρανση. Το χρώμα του ημίσκληρου Ανθότυρου κυμαίνεται από ανοιχτό κίτρινο έως λευκό και έχει πιο έντονη και πικάντικη γεύση σε σύγκριση με τη φρέσκια ποικιλία, με πιο πλούσιο γαλακτοκομικό προφίλ (<https://www.kalogeraki.gr>).

Οι αυστηροί κανονισμοί του ΠΟΠ καθορίζουν ότι πρέπει να έχει συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε σάκχαρα (λακτόζη), τουλάχιστον 18% λιπαρά και υγρασία όχι μεγαλύτερη από 70%. Ένα αντιδραστήριο οξίνισης, όπως ένα υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος, προστίθεται σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν χρησιμοποιείται βόειος ορός γάλακτος, για να βοηθήσει στην καθίζηση των πρωτεϊνών ορού γάλακτος κατά τη διαδικασία παραγωγής. Τα τυριά μπορούν να καταναλωθούν αμέσως ή αφού αλατιστούν περαιτέρω.

### **2.6.2. Μανούρι**

Στην τυροκομία, το τυρί μανούρι - ένα τυπικό τυρί ορού γάλακτος από τη Θεσσαλία, τη Δυτική και την Κεντρική Μακεδονία - κατέχει ιδιαίτερη θέση καθώς είναι το πρωτογενές προϊόν και όχι ένα υποπροϊόν. Με ελάχιστο λίπος σε ξηρή ουσία (FDM, Fat Dry Matter) 70% και μέγιστη περιεκτικότητα σε υγρασία 60%, καταφέρνει να αποκτήσει μοναδική ποιότητα παρά το ότι προέρχεται από τυρί ορού γάλακτος. Το μανούρι, το οποίο παρασκευάζεται από ορό γάλακτος και πρόβειο και κατσικίσιο γάλα ή/και κρέμα, έλαβε την ονομασία Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή το 1996. Οι μέσες διαστάσεις αυτού του μαλακού τυριού είναι 10–12 cm σε διάμετρο και 20 – Ύψος 30 cm. Χαρακτηρίζεται από συμπαγές, κλειστό σώμα και πλούσια, κρεμώδη γεύση με εμφανείς λιπαρούς τόνους.

Το τυρόγαλα που προορίζεται για την παρασκευή του, υποβάλλεται αρχικά σε διήθηση ή φυγοκέντρηση για να αφαιρεθούν τυχόν κόκκοι πήγματος. Στη συνέχεια, εμπλουτίζεται με κρέμα πρόβειου ή γίδινου γάλακτος ώστε να επιτευχθεί λιποπεριεκτικότητα τουλάχιστον 2,5%. Ακολουθεί θέρμανση με συνεχή ανάδευση έως ότου η θερμοκρασία φτάσει στους 88-90 °C σε διάστημα 40-45 λεπτών. Όταν το τυρόγαλα φτάσει στους 70-75 °C, προστίθεται περίπου 1% χλωριούχο νάτριο και πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή κρέμα τους σε αναλογία μέχρι 25%. Στους 80 °C εμφανίζονται οι πρώτες νιφάδες εξαιτίας της δομής των πρωτεϊνών του ορού, οπότε η ανάδευση επιβραδύνεται σημαντικά μέχρι πλήρους παύσης. Η διαδικασία θέρμανσης συνεχίζεται στο εύρος θερμοκρασίας 88-90 °C και στη συνέχεια το πήγμα μεταφέρεται σε υφασμάτινους σάκους σχήματος κυλίνδρου για στράγγιση, που

διαρκεί 4-5 ώρες. Μετά τη στράγγιση, το τυρί μεταφέρεται σε ψυκτικούς θαλάμους συντήρησης (Parademas et al., 2017).

Η παραγωγή του βιοτεχνικού Μανουριού περιορίζεται στη βόρεια περιοχή της Ελλάδας και συγκεκριμένα στη Δυτική Μακεδονία. Η παρασκευή του είναι μια εποχιακή διαδικασία που λαμβάνει χώρα από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο. Περιλαμβάνει τη χρήση αιγοπρόβειου γάλακτος και μια μοναδική διαδικασία. Ο ορός γάλακτος που έφτιαχναν τον Μπάτζο, ένα λευκό τυρί άλμης, χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού μανούρι. Μια ξύλινη κουτάλα χρησιμοποιείται για να «χτυπήσει» το γάλα, σπάζοντας το λίπος και αναγκάζοντας το να βγει στην επιφάνεια. Ο Μπάτζος ανασύρεται από τον ίδιο κάδο αφού τον πήξουν με λίγη πυτιά. Ο ορός γάλακτος που έχει απομείνει, ο οποίος έχει ενισχυθεί με το μεγαλύτερο μέρος του λίπους, θερμαίνεται στους 85 °C ενώ αναδεύεται συνεχώς. Το πλωτό τυρόπηγμα στη συνέχεια πλάθεται σε τυρόπανα και στραγγίζεται. Κατά συνέπεια, ο Μπάτζος είναι τυρί με χαμηλά λιπαρά, ενώ ο ορός γάλακτος, ο οποίος είναι βαρύς σε λιπαρά, χρησιμοποιείται για την παραγωγή καλύτερης ποιότητας Μανουριού (Bintsis et al., 2024).

### 2.6.3. Μυζήθρα

Η Μυζήθρα είναι ένα μαλακό τυρί άμορφου σχήματος με συμπαγή δομή, συνήθως κυλινδρικό, χωρίς επιδερμίδα και οπές, παρουσιάζοντας λευκό ή υπόλευκο χρώμα και έχοντας ξινή έως υπόγλυκη γεύση και κοκκώδη έως αλοιφώδη υφή. Η μέγιστη υγρασία της φτάνει το 55% κατά βάρος, ενώ η ελάχιστη λιποπεριεκτικότητά της είναι 45% επί ξηρής ουσίας. Οι αλκοόλες και οι κετόνες είναι οι πτητικές ομάδες που βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα στο τυρί Μυζήθρα. Η εμπορική Μυζήθρα έχει μέσες τιμές 0,13 mg/100 g συζευγμένου λινολεϊκού οξέος και 42,7 mg/100 g περιεκτικότητας σε χοληστερόλη (Parademas και Bintsis, 2024)

Παράγεται από τυρόγαλο που προέρχεται αποκλειστικά από αιγοπρόβειο γάλα, το οποίο χρησιμοποιείται για την τυροκόμηση γραβιέρας, κεφαλοτύρι ή κεφαλογραβιέρας λόγω του υψηλότερου περιεκτικού του σε λίπος. Το αιγοπρόβειο τυρόγαλο περιέχει περισσότερες υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες σε σχέση με το αγελαδινό γάλα, κάτι που καθιστά την παραγωγή μυζήθρας απλούστερη και την απόδοσή της

υψηλότερη (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011). Ωστόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και αγελαδινός ορός γάλακτος

Η Μυζήθρα παρασκευάζεται με θέρμανση, υπό συνεχή ανάδευση του ορού γάλακτος σε μέγιστη θερμοκρασία 88–92 °C εντός 40–45 λεπτών. Για τη βελτίωση της ποιότητας της το πλήρες γάλα αναμιγνύεται με ορό γάλακτος σε αναλογία 3-5% όταν η θερμοκρασία του ορού γάλακτος φτάσει τους 65-70 °C. Επιπλέον, κατά τη θέρμανση του ορού γάλακτος, προστίθεται αλάτι σε ποσοστό 1-1,5% (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011). Μερικές φορές, αυτό το τυρόπηγμα πρωτεϊνών καταναλώνεται λίγο μετά την παρασκευή του, ζεστό, με ή χωρίς προσθήκη αλατιού.

Η Ξινομυζήθρα είναι ένα μαλακό τυρί με υφή που κυμαίνεται από κοκκώδη έως κρεμώδη, με μέγιστη υγρασία 55% και τουλάχιστον 45% λιπαρά επί ξηρού. Αναγνωρίζεται ως «παραδοσιακό προϊόν της Κρήτης» και φτιάχνεται από τον ορό γάλακτος που απομένει κατά την παραγωγή των τυριών κεφαλοτύρι και γραβιέρα, τα οποία συνήθως παρασκευάζονται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα ή από μείγμα αυτών, όπως ορίζεται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών. Η διαδικασία παραγωγής της ξεκινά με την παρασκευή της Μυζήθρας, η οποία μετά το μαγείρεμα και το στράγγισμα, πιέζεται για μία εβδομάδα. Έπειτα, το τυρί αλατίζεται και τοποθετείται σε βαρέλια, τα οποία μεταφέρονται σε χώρους με θερμοκρασία 5-10 °C για να ωριμάσει για δύο μήνες. (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2011).

Η διαδικασία παρασκευής της Ξινομυζήθρας Κρήτης ξεκινά με τη διήθηση ή τη φυγοκέντρηση του τυρογάλακτος για την απομάκρυνση πιθανών κόκκων πήγματος. Ακολούθως, το τυρογάλακτο υποβάλλεται σε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση, φτάνοντας μέχρι τους 92°C εντός περίπου 30 λεπτών. Στα 68-70 °C περίπου, προστίθεται ένα μικρό ποσοστό έως 15% κατά βάρος πλήρους γάλακτος πρόβειου ή γίδινου. Κατά τη διάρκεια θέρμανσης μέχρι τους 80°C, εμφανίζονται νιφάδες πήγματος, η οποία στη συνέχεια απαιτεί υπομονή για πλήρη παύση ανάδευσης. Αφού παραμείνει ακίνητο για περίπου 30 λεπτά, το πήγμα μεταφέρεται σε καλούπια για στράγγιση διάρκειας 3 έως 5 ωρών. Αμέσως μετά τη στράγγιση, προστίθεται αλάτι στο πήγμα (περίπου 1,5-2,0%) και αναμιγνύεται προσεκτικά για ομοιογενή σύσταση. Στη συνέχεια, το πιεσμένο πήγμα τοποθετείται σε βαρέλια, όπου παραμένει για τουλάχιστον δύο μήνες σε θερμοκρασία κάτω των 10°C για να ωριμάσει. Η διάρκεια ωρίμανσης συμβάλλει στην ανάπτυξη χαρακτηριστικών



γεύσης, ενώ τα βαρέλια τοποθετούνται ανεστραμμένα για να διαχειρίζονται τυχόν υγρασία που αποβάλλεται.

## **2.7. Ρουμανικά τυριά τυρογάλακτος**

Το παραδοσιακό Ρουμανικό τυρί που ονομάζεται ούρδα παρασκευάζεται από ορό γάλακτος από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα, αλλά δεν έχει εξεταστεί ή περιγραφεί καλά. Παράγεται ως επί το πλείστον ως τυρί στη φάρμα, σε μεγάλο υψόμετρο (1500 μ.) στην περιοχή της Κόνιτσας της Ηπείρου. Το τυρί μπορεί να αφηθεί να ωριμάσει στον αέρα για 20 έως 30 ημέρες σε δροσερές τοποθεσίες φάρμας, όπως κελάρια, αποθήκες ή καταφύγια. Μετά από αυτό, μπορεί να αποθηκευτεί στον αέρα σε ψυγείο ή άλλο κρύο περιβάλλον για έως και ένα χρόνο. Το ώριμο τυρί ευνοείται πολύ από τους πελάτες στις τοπικές αγορές και έχει πλούσια γεύση και άρωμα.

Παρουσιάζει μια χαρακτηριστική υφή που είναι λεία και κρεμώδης, παρόμοια με το τυρί Ricotta. Το χρώμα του κυμαίνεται συνήθως από λευκό έως υπόλευκο, αντικατοπτρίζοντας τη σύνθεση και τις μεθόδους επεξεργασίας του. Η γεύση του τυριού Urda είναι ήπια και ελαφρώς γλυκιά, συνοδευόμενη από μια λεπτή γαλακτοκομική γεύση που ποικίλλει ανάλογα με τις τεχνικές παραγωγής και την ποιότητα του ορού γάλακτος που χρησιμοποιείται.

Όσον αφορά το pH, το τυρί Urda τείνει να είναι ελαφρώς όξινο και γενικά πέφτει μεταξύ 5,0 και 5,5. Συχνά έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, αν και αυτό μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τις τοπικές προτιμήσεις και τις συγκεκριμένες συνταγές. Η περιεκτικότητα σε υγρασία του τυριού είναι σχετικά υψηλή, συμβάλλοντας στην κρεμώδη υφή του και στην υφή του που μπορεί να απλωθεί. Σε αντίθεση με τα παλαιωμένα τυριά, το Urda καταναλώνεται συνήθως φρέσκο και δεν υφίσταται εκτεταμένη διαδικασία ωρίμανσης, με αποτέλεσμα μικρότερη διάρκεια ζωής.

Διατροφικά, το τυρί Urda προσφέρει αξιοσημείωτη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη και είναι πηγή βασικών μετάλλων όπως το ασβέστιο και ο φώσφορος. Περιέχει χαμηλότερα επίπεδα λίπους σε σύγκριση με τα τυριά που παρασκευάζονται από πλήρες γάλα, ευθυγραμμιζόμενο με τις διατροφικές προτιμήσεις για ελαφρύτερες επιλογές γαλακτοκομικών. Μικροβιακά, το Urda υποστηρίζει την ανάπτυξη

ωφέλιμων βακτηρίων γαλακτικού οξέος, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη της γεύσης και στη συνολική ποιότητά του.

## **2.8. Βραζιλιάνικα τυριά τυρογάλακτος**

### **2.8.1. Requeijão**

Η συνεισφορά της Βραζιλίας στα τυριά ορού γάλακτος είναι το Requeijão, ένα κρεμώδες τυρί που μπορεί να επαλείφεται με ελαφρώς πικάντικη γεύση. Το Requeijão απλώνεται συνήθως στο ψωμί, χρησιμοποιείται ως γέμιση για αρτοσκευάσματα ή προστίθεται σε πιάτα για επιπλέον κρεμώδη υφή. Φυσικά, το requeijão cremoso έχει συνήθως υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, συμβάλλοντας στην κρεμώδη σύστασή του. Αυτό το άλειμμα τυριού περιέχει συχνά περίπου 50-60% υγρασία κατά βάρος, γεγονός που του δίνει την απαλή και αλειφόμενη υφή του. Η περιεκτικότητα σε υγρασία επηρεάζει τις απαιτήσεις αποθήκευσης, απαιτώντας συχνά την ψύξη για τη διατήρηση της φρεσκάδας. Χημικά, αποτελείται κυρίως από γαλακτοκομικά λίπη και πρωτεΐνες. Το επίπεδο pH του requeijão cremoso είναι ελαφρώς όξινο, τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 5,5 και 6,5, το οποίο συμβάλλει στο αρωματικό προφίλ του και βοηθά στην παράταση της διάρκειας ζωής του αναστέλλοντας τη μικροβιακή ανάπτυξη (Belsito et al., 2017).

Το Requeijao παρασκευάζεται παραδοσιακά με θέρμανση του αρχικού συστατικού, όπως ο ορός γάλακτος προβάτου ή μείγματα αυτού με πρόβειο ή αιγοπρόβειο γάλα, για περίπου 30 λεπτά ενώ ανακατεύετε απαλά το μείγμα σε θερμοκρασία μεταξύ 90 και 100 °C. Αφού το τυρόπηγμα έρθει στην κορυφή μόνο του, στραγγίζεται σε πλαστικά καλούπια και παραμένει εκεί μέχρι να κυρώσει. Αυτή η διαδικασία κατασκευής χρησιμοποιεί τεχνολογικές παραμέτρους που καθιερώθηκαν πειραματικά και δεν έχει γίνει ακόμη συστηματική, ακαδημαϊκή μελέτη που να στοχεύει στην ποσοτικοποίηση της επίδρασης κάθε παραμέτρου επεξεργασίας στις ιδιότητες του τελικού προϊόντος (Pintado et al., 1996).

## **2.9. Τυριά τυρογάλακτος από άλλες περιοχές**

Η Νορβηγία φημίζεται για τα υψηλής ποιότητας τυριά ορού γάλακτος όπως το Brunost και το Gjetost. Το Brunost, γνωστό και ως καστανό τυρί, έχει μια καφέ, γλυκιά

εμφάνιση με υφή σαν φοντάν και καραμελωμένη γεύση. Παρασκευάζεται με βρασμό ορού γάλακτος, κρέμας γάλακτος και γάλακτος. Το Brunost συνήθως κόβεται σε λεπτές φέτες και σερβίρεται σε ψωμί ή τραγανό ψωμί. Το Gjetost είναι παρόμοιο με το Brunost, αλλά παρασκευάζεται κυρίως από ορό γάλακτος κατσικίσιου γάλακτος, δίνοντάς του μια πιο δυνατή, πιο μαύρη γεύση. Σερβίρεται επίσης συνήθως σε ψωμί ή κράκερ, μερικές φορές με λίγο βούτυρο.

Τα περισσότερα από αυτά τα προϊόντα, μετά από σημαντική εξάτμιση ορού γάλακτος και επιπλέον γάλακτος ή/και κρέμας, έχουν συνολική περιεκτικότητα σε στερεά περίπου 80% (Skeie and Abrahamsen, 2017). Το καστανό τυρί έχει τη λεία, κρεμώδη ουσία του νεαρού τυριού τσένταρ με την όψη ανοιχτής ή σκούρας καραμέλας. Μπορεί να έχει μια ξινή γεύση ανάλογα με τον ορό γάλακτος που χρησιμοποιείται, αλλά η λακτόζη του δίνει μια κυρίως κρεμώδη και ήπια γλυκιά γεύση. Σύμφωνα με τους Gobbetti et al. (2018), το καστανό τυρί συνήθως κατηγοριοποιείται ως προϊόν που μοιάζει με τυρί παρά ως αληθινό τυρί (Gobbetti et al., 2018). Αρχικά το μίγμα ορού γάλακτος-κρέμας συμπυκνώνεται (συνήθως σε έναν εξατμιστή κενού πολλαπλών σταδίων) σε περίπου 60% συνολικά στερεά. Στη συνέχεια ακολουθεί μια δεύτερη διαδικασία συμπύκνωσης (σε >80% των συνολικών στερεών), η οποία απαιτεί ισχυρότερο κενό. Η πλαστική μάζα που προκύπτει θερμαίνεται στους 95 °C περίπου. Προκειμένου να αποκτήσουν το επιθυμητό τελικό χρώμα και γεύση αυτών των τυριών, η αντίδραση Maillard προωθείται σε όλη τη διαδικασία παρασκευής. Μετά την ψύξη, το συμπύκνωμα ζυμώνεται και συσκευάζεται (Gobbetti et al., 2018).

Τέλος, το τυρί Lor της Τουρκίας (Lor Peynir) είναι ένα μαλακό, εύθρυπτο τυρί με ήπια γεύση, φτιαγμένο από ορό γάλακτος διαφόρων τυριών. Χρησιμοποιείται σε επιδόρπια, αρτοσκευάσματα και ως άλειμμα ή γέμιση. Το τυρί Lor χαρακτηρίζεται από την υψηλή περιεκτικότητά του σε υγρασία, που τυπικά κυμαίνεται από 70% έως 80%. Αυτό το υψηλό επίπεδο υγρασίας δίνει στο τυρί Lor τη χαρακτηριστική απαλή και κρεμώδη υφή του, καθιστώντας το εύκολο να απλωθεί και να αναμειχθεί σε διάφορα πιάτα. Η υφή είναι κάπως κοκκώδης αλλά λεία, παρόμοια με το τυρί ρικότα, γεγονός που το καθιστά ευέλικτο για χρήση. Το επίπεδο pH του τυριού Lor είναι ήπια όξινο, συνήθως μεταξύ 5,6 και 6,5. Αυτή η ήπια οξύτητα συμβάλλει στην απαλή

πικάντικη γεύση του, η οποία είναι λιγότερο έντονη από αυτή ενός πιο παλαιωμένου τυριού

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά στο τυρί Lor είναι σχετικά χαμηλή, και ανέρχεται σε ποσοστό 1% και 8%. Αυτή η χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οφείλεται κυρίως στο ότι το τυρί Lor παρασκευάζεται από ορό γάλακτος, ο οποίος είναι υποπροϊόν άλλων διεργασιών τυροκομίας και περιέχει λιγότερα λιπαρά από το αρχικό γάλα. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη στο τυρί Lor είναι μέτρια, κυρίως αποτελείται από πρωτεΐνες ορού γάλακτος, όπως η βήτα-λακτοσφαιρίνη και η άλφα-λακταλβουμίνη. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι εύκολα εύπεπτες και συμβάλλουν στη θρεπτική αξία του τυριού, καθιστώντας το μια καλή πηγή πρωτεΐνης υψηλής ποιότητας.

Επίσης, διατηρεί μια μέτρια ποσότητα λακτόζης, η οποία συμβάλλει στην ελαφρώς γλυκιά γεύση του. Η περιεκτικότητα σε λακτόζη μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τη συγκεκριμένη διαδικασία παραγωγής αλλά είναι γενικά χαμηλότερη από αυτή του φρέσκου γάλακτος. Η περιεκτικότητα σε τέφρα, που αντιπροσωπεύει την περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα του τυριού, περιλαμβάνει βασικά μέταλλα όπως το ασβέστιο και ο φώσφορος, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την υγεία των οστών. Η περιεκτικότητα σε τέφρα κυμαίνεται συνήθως γύρω στο 1%, συμβάλλοντας στο διατροφικό προφίλ του τυριού.

#### Μικροχλωρίδα των τυριών τυρογάλακτος

Η ποσότητα των βακτηρίων στον ορό γάλακτος είναι συνήθως υψηλότερη από ό,τι στο γάλα, επειδή η διαδικασία παρασκευής του τυριού ενθαρρύνει την ανάπτυξη βακτηρίων, ακόμη και όταν χρησιμοποιείται παστεριωμένο γάλα επειδή προστίθενται καλλιέργειες βακτηρίων εκκίνησης. Κατά συνέπεια, για να αξιοποιηθεί σωστά αυτό το υλικό, το μικροβιολογικό σενάριο πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά τόσο από ποσοτική όσο και από ποιοτική άποψη. Η πλειονότητα των βακτηρίων γαλακτικού οξέος στη μικροχλωρίδα του ορού γάλακτος προέρχεται από τα γένη *Lactobacillus* και *Streptococcus*, ενώ άλλα είδη - όπως τα τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρους και τα μη σποροειδή - υπάρχουν συνήθως σε μικρότερες ποσότητες και μπορεί να είναι σημάδι ορισμένων χαρακτηριστικών ή

ζητημάτων κατά την επεξεργασία ή/και αποθήκευση του ορού γάλακτος (Da Silva et al., 2020).

Οι καλλιέργειες εκκίνησης και οι δευτερεύουσες ή μη αρχικές καλλιέργειες αποτελούν τις δύο κύριες κατηγορίες της μικροχλωρίδας που βρίσκεται στο τυρί (Fox et al. 2017). Οι καλλιέργειες εκκίνησης περιλαμβάνουν κυρίως *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis*, *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii* και προστίθενται σκόπιμα στο γάλα προκειμένου να εκκινήσει η ζύμωση. Η επιλογή της αρχικής καλλιέργειας επηρεάζεται από το είδος του τυριού και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του. Κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης του τυριού, καλλιέργειες εκκίνησης και καλλιέργειες βακτηρίων που δεν εκκινούν συνδυάζονται στη μήτρα του τυριού για να ξεκινήσουν ένα σύνθετο δίκτυο βιοχημικών γεγονότων, τα οποία καθορίζουν τη γεύση και την υφή του τυριού. Ο δευτερογενής μικροβιακός πληθυσμός αποτελείται από ένα μείγμα βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μούχλας και συχνά συνδέεται με το είδος του τυριού (Beresfor et al., 2001).

Γενικά, μεταβλητές όπως η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς, το pH, η ενεργότητα του νερού, η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και η σύνθεση της ανώτερης ατμόσφαιρας επηρεάζουν το πόσο γρήγορα αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί. Λόγω του υψηλού pH, της υψηλής περιεκτικότητας σε υγρασία και της χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι, τα φρέσκα τυριά ορού γάλακτος είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στη μικροβιακή αλλοίωση, ιδιαίτερα από μούχλα, ζυμομύκητες και εντεροβακτηρίδια. Σημαντική ευπάθεια στη μικροβιακή αλλοίωση παρατηρείται ακόμη και σε περιπτώσεις όπου ο οξινομένος ορός γάλακτος χρησιμοποιείται στην τυροκομία, μετά από θέρμανση 10 λεπτών στους 80 °C. Αυτό πιθανώς οφείλεται σε μόλυνση και σπορίωση μετά τη θέρμανση του ορού γάλακτος.

Η μικροβιακή σύνθεση του τυριού Ricotta αποτελείται κυρίως από ωφέλιμα βακτήρια γαλακτικού οξέος όπως τα είδη *Lactobacillus* και *Streptococcus*, τα οποία συμβάλλουν στην ήπια πικάντικη γεύση του και βοηθούν στη διαδικασία ζύμωσης. Ωστόσο, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε υγρασία, η Ricotta είναι ευαίσθητη σε αλλοίωση από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των ζυμομυκήτων και των μούχλας, εάν δεν διατηρηθεί επαρκώς στο ψυγείο. Η αρχική μικροβιακή ποιότητα του ορού γάλακτος, η υγιεινή κατά την παραγωγή και οι

συνθήκες αποθήκευσης παίζουν κρίσιμους ρόλους στον καθορισμό της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής του τυριού. Η σωστή παστερίωση του ορού γάλακτος και οι πρακτικές υγιεινής χειρισμού είναι απαραίτητες για να ελαχιστοποιηθεί η μικροβιακή μόλυνση και να διασφαλιστεί ότι το τυρί παραμένει ασφαλές για κατανάλωση (Casti et al., 2016).

Σχετικά με τη μικροβιακή ποικιλομορφία στο μανούρι, η μελέτη των Lioliou et al. Έδειξε ότι σε ένα διάστημα 20 ημερών όλοι οι αριθμοί μικροβιακών ομάδων αυξήθηκαν κατά την αποθήκευση και κορυφώθηκαν στα τυριά που παρασκευάζονται το καλοκαίρι σε αντίθεση με τα τυριά που παρασκευάζονται την άνοιξη. Επιπλέον, παρατήρησαν ότι ειδικά το καλοκαίρι, τα μικρόβια άνθιζαν περισσότερο στο εξωτερικό του τυριού παρά στο εσωτερικό του. Ακόμη αναφέρθηκε ότι η ανάπτυξη των βακτηρίων και των ζυμών δεν φαίνεται να επηρεάζεται από το pH (6,78–7,33) ή τη συγκέντρωση αλατιού σε υγρασία (2,53–3,72). Το στέλεχος *Hafnia spp.* αποτελούσε την πλειοψηφία των *Enterobacteriaceae spp.* ενώ οι σταφυλόκοκκοι αποτελούσαν την πλειοψηφία των απομονώσεων από το μέσο Baird–Parker. Αν και τα είδη ζύμης ήταν πολύ διαφορετικά, τα *Debaromyces hansenii* και *Pichia membranefasciens* ήταν τα πιο κοινά (Lioliou et al., 2001).

## 2.10. Νέας τεχνολογίας τυριά τυρογάλακτος

Αποξηραμένο συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (65%) χρησιμοποιήθηκε αντί του νωπού ορού γάλακτος για τη δημιουργία μιας τροποποιημένης εκδοχής του τυριού Μυζήθρα. Σε σύγκριση με τον έλεγχο του τυριού Μυζήθρα, η τροποποιημένη έκδοση είχε μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λακτόζη, κάλιο και νάτριο, αλλά μικρότερη ποσότητα ολικών βακτηρίων, πρωτεΐνης, τέφρας, ασβεστίου, σκληρότητας και συγκολλητικότητας. Επίσης, από το τελικό προϊόν έλειπαν οι ζυμομύκητες και οι μούχλες (Kaminarides, 2015). Ένα νέο τυρί ορού γάλακτος με καλύτερες ιδιότητες για την υγεία, αποδεκτές ιδιότητες υφής, πλούσιο άρωμα και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής δημιουργήθηκε συνδυάζοντας 65% συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος, φυτικό λίπος και 15% ελαιόλαδο. Το προϊόν στη συνέχεια ενισχύθηκε με φύλλα θυμαριού, συσκευάστηκε σε φιλμ και θερμάνθηκε (Zoidou et al., 2016).

Σε μια άλλη μελέτη παρασκευάστηκαν κρεμώδη και επαλειφόμενα προβιοτικά τυριά κατσικίσιου ορού γάλακτος δημιουργήθηκαν με την προσθήκη δεύτερης σκόνης τυριού ορού γάλακτος (SCWP). Ο *Lactobacillus rhamnosus*, το *Bifidobacterium animalis*, το κιτρικό νάτριο και το αιθέριο έλαιο θυμαριού ήταν όλα παρόντα στα εμπορεύματα και οι προβιοτικές μήτρες τυριού ορού γάλακτος, τόσο με όσο και χωρίς προσθήκες, παρασκευάστηκαν και διατηρήθηκαν για 21 ημέρες στους 5 °C. Οι μελέτες έδειξαν ότι με την πάροδο του χρόνου δεν μεταβλήθηκαν τα χαρακτηριστικά τους (Garcia et al., 2022).

Ένα νέο τυρί Μυζήθρα μειωμένων λιπαρών με υψηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο και μαγνήσιο ενώ ένα τροποποιημένο τυρί Μυζήθρα παρασκευάστηκε με αντικατάσταση του ορού γάλακτος με 65% συμπύκνωμα αποξηραμένης πρωτεΐνης ορού γάλακτος από τους ίδιους ερευνητές (Kaminarides et al., 2021)

### **2.11. Θέματα ασφάλειας και συντήρησης τυριών τυρογάλακτος**

Καθώς η παραγωγή τυριού βασίζεται εν μέρει στην επιλεγμένη ανάπτυξη μικροοργανισμών, τέτοιες συνθήκες μπορούν επίσης να επιτρέψουν τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων μικροβίων. Το γάλα, το οποίο είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, προορίζεται να δώσει στα νεογέννητα ζώα ολόκληρη την κύρια διατροφή τους. Λόγω του σχεδόν ουδέτερου pH του, το γάλα είναι επίσης ένα εξαιρετικό μέσο καλλιέργειας για τα συγκεκριμένα βακτήρια που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή τυριού. Έτσι, αυτό ισχύει και για τα μολυσματικά μικρόβια, όπως αυτά που συνδέονται με ελαττώματα και αλλοιώσεις, καθώς και εκείνα που είναι επιβλαβή για τους ανθρώπους.

Οι περιβαλλοντικοί ρύποι συνήθως προσκολλώνται στο εξωτερικό των θηλών και διαρρέουν στο γάλα κατά τη συλλογή. Αυτοί οι ρύποι μπορούν να βρεθούν σε βρωμιά, περιττώματα και υλικά κλινοστρωμνής. Ένα μέρος αυτών των μικροβίων έχει τη δυνατότητα να μολύνει το κανάλι της θηλής και να αποβάλλεται στο γάλα. Τέλος, ο ανεπαρκής καθαρισμός και η υγιεινή μπορεί να αφήσουν βακτήρια στις επιφάνειες του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για το άρμεγμα και την επεξεργασία, τα οποία μπορεί να λερώσουν το γάλα. Σύμφωνα με τους Lafarge η ελάχιστη υγιεινή του μαστού διατηρεί χρήσιμα μέλη της τυροκομικής χλωρίδας, συμπεριλαμβανομένων

των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) και των ειδών των γενών *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Brevibacterium* και *Staphylococcus*.

Δεδομένου ότι η βέλτιστη παραγωγικότητα, η ποιότητα και η ασφάλεια του τυριού εξαρτώνται από το γάλα με καλή μικροβιολογική ποιότητα, η μόλυνση αποτελεί σημαντική πηγή ανησυχίας για τους τυροκόμους. Μεταβάλλοντας ενζυματικά τα συστατικά του γάλακτος, μια πληθώρα αλλοιωτικών οργανισμών μπορεί να προκαλέσει επιζήμιες αλλοιώσεις στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τυριού. Επιπλέον, κατά τη διαδικασία παραγωγής, ακαθαρσίες.

Τα περισσότερα τυριά παράγονται από θερμικά επεξεργασμένο γάλα, ενώ αρκετά από νωπό γάλα. Όλα τα φυτικά βακτήρια που είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο και ένα σημαντικό ποσοστό βακτηρίων αλλοίωσης εξαλείφονται με τη σύγχρονη παστερίωση. Το παστεριωμένο γάλα θα πρέπει να έχει πολύ χαμηλό συνολικό αριθμό βακτηρίων, εάν είναι φτιαγμένο από νωπό γάλα εξαιρετικής ποιότητας και στη συνέχεια χρησιμοποιείται με υγιεινό τρόπο. Ο Κώδικας Υγιεινής Πρακτικής της Επιτροπής Codex Alimentarius για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (30) περιγράφει τις απαιτήσεις για την παστερίωση του γάλακτος, οι οποίες είναι ίδιες με εκείνες στις ΗΠΑ και την ΕΕ. Η νόμιμη παστερίωση σε αυτές τις περιοχές απαιτεί συγκεκριμένους συνδυασμούς χρόνου-θερμοκρασίας, συνήθως 72°C για 15 δευτερόλεπτα ή 63°C για 30 λεπτά, ή οποιονδήποτε άλλο εγκεκριμένο ισοδύναμο συνδυασμό.

Η παστερίωση δεν μπορεί να καταστρέψει πλήρως πληθυσμούς βακτηριακών ενδοσπόρων που αντέχουν σε θερμική έκθεση 80°C για 10 λεπτά ή μη σχηματίζοντας σπόρια θερμοδουρικά βακτήρια που μπορούν να αντέξουν στους 63°C για 30 λεπτά. Πολλά gram-θετικά βακτήρια εξαλείφονται μαζί με τα περισσότερα, αν όχι όλα, αρνητικά κατά Gram βακτήρια (ιδιαίτερα τα ψυχότροφα). Ωστόσο, ορισμένα θερμοανθεκτικά είδη *Enterococcus*, *Streptococcus* (ιδιαίτερα *S. thermophilus*), *Microbacterium*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium* και *Corynebacterium* μπορεί να αντέξουν. Η πλειονότητα των μη σποριωδών θερμοανθεκτικών βακτηρίων που επιβιώνουν όπως για παράδειγμα τα είδη *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* και *Microbacterium* δεν θεωρείται ότι αλλοιώνουν το τυρί.

Άλλα LAB, συμπεριλαμβάνουν είδη ορισμένων εντερόκοκκων (κυρίως *E. faecalis*, *E. faecium* και/ή *E. durans*) και *Leuconostoc* (κυρίως τα είδη *Leuconostoc*



*mesenteroides* και *Leuconostoc pseudomesenteroides*) Επιπλέον βακτήρια LAB, συμπεριλαμβανομένων των μελών των γενών *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Weissella*, καθώς και μέλη των γενών *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, θα μπορούσαν επίσης να ανιχνευθούν σε μικρότερη σχετική αφθονία. Τα αλλοιωγόνα και τα παθογόνα βακτήρια που ανιχνεύονται συχνά στο τυρί, περιλαμβάνουν τα γένη *Clostridium*, συμπεριλαμβανομένων των *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium perfringens* και *Clostridium butyricum*, *Staphylococcus*, συμπεριλαμβανομένων των *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *E. coli*, *Bacillus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* και μέλη των γενών *Enterobacter*, *Psychrobacter*, *Proteus*, *Serratia* και *Halomonas* (Kamilari et al., 2019).

Ενώ οι ζυμομύκητες μπορεί να υπάρχουν στο φρέσκο γάλα, η μόλυνση μετά την παστερίωση είναι συνήθως η αιτία της αλλοίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων που προκαλείται από ζυμομύκητες και μούχλες, καθώς και οι δύο είναι διαδεδομένοι ατμοσφαιρικοί ρύποι και μπορούν να ευδοκιμήσουν στο περιβάλλον των γαλακτοκομικών προϊόντων. Το μικροβίωμα του τυριού αποτελείται επίσης από μαγιά, όπως *Kluyveromyces lactis*, *Candida spp.*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* και *Geotrichum candidum*, και μέλη των γενών *Geotrichum*, *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus* και *Fusarium*. Η ανάπτυξη ζυμομυκήτων και μούχλας στο γάλα προκαλεί φρουτώδεις και ευχάριστες οσμές. Έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την πρωτεΐνη και να μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ στο τυρί, απελευθερώνοντας αμινοξέα και αμμωνία που αυξάνουν το pH και προκαλούν τις χαρακτηριστικές αλλαγές υφής που προκαλεί η πρωτεόλυση. Ενώ ορισμένες αερομεταφερόμενες ζύμες, όπως οι *Debaryomyces hansenii*, *Candida spp.* και *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, ενισχύουν συχνά τη γεύση ορισμένων τυριών, οι ζύμες έχουν την ικανότητα να προκαλούν ετεροζυμωτική μεταβολική αλλοίωση, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή αιθανόλης και των σχετικών ζυμωμένων μη γεύσεων.

Το οικοσύστημα που βρίσκεται στο τυρί παρέχει ένα μοναδικό περιβάλλον για να συνυπάρχουν νηματώδεις μύκητες, βακτήρια και μαγιά. Οι πρώτες ζύμες που κυριαρχούν είναι ανθεκτικές στο αλάτι και στα οξέα. Μπορούν να διασπάσουν το γαλακτικό που παράγει το SLAB και να δημιουργήσουν NH<sub>3</sub> από αμινοξέα. Σύμφωνα με τους Gonçaves Dos Santos et al. (2017), η προέλευση της μαγιάς στο τυρί δεν

περιορίζεται στο γάλα καθώς προέρχεται επίσης από τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης κατά τη διαδικασία ζύμωσης του τυριού. Μαζί με άλλους μικροοργανισμούς, οι ζυμομύκητες που υπάρχουν στο περιβάλλον του νωπού γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων μπορούν εύκολα να εγκατασταθούν στην επιφάνεια του φρέσκου τυριού και να δημιουργήσουν ένα σύνθετο βιοφίλμ (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Στο τυρί, τα βακτήρια μπορούν να μεταβολίσουν το γαλακτικό οξύ και να υδρολύσουν την πρωτεΐνη, απελευθερώνοντας αμμωνία και αμινοξέα, με αποτέλεσμα αύξηση του pH καθώς και χαρακτηριστικές αλλαγές στην υφή που προκαλούνται από την πρωτεόλυση.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η παραγωγή τυριού ορού γάλακτος διέπεται από ένα ολοκληρωμένο σύνολο κανονισμών που στοχεύουν στη διασφάλιση υψηλών προτύπων υγιεινής, ασφάλειας και ποιότητας. Η δέσμη μέτρων για την υγιεινή της ΕΕ, ιδίως ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 852/2004 για την υγιεινή των τροφίμων και ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. Αυτό περιλαμβάνει την εφαρμογή συστημάτων ανάλυσης κινδύνου και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) για την αποτελεσματική διαχείριση των κινδύνων για την ασφάλεια των τροφίμων. Επιπλέον, ορισμένα τυριά ορού γάλακτος, όπως το Ricotta Romana, απολαύουν του καθεστώτος Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (ΠΟΠ) βάσει του κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 1151/2012, πράγμα που σημαίνει ότι πρέπει να παράγονται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές σύμφωνα με παραδοσιακές μεθόδους. Η επισήμανση των τυριών ορού γάλακτος στην ΕΕ πρέπει να συμμορφώνεται με τον κανονισμό (ΕΕ) αριθ. 1169/2011, διασφαλίζοντας ότι παρέχονται στους καταναλωτές λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα συστατικά, τα αλλεργιογόνα, τις θρεπτικές αξίες και την προέλευση του προϊόντος (European Union).

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η παραγωγή τυριού ορού γάλακτος ρυθμίζεται από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) σύμφωνα με τον Τίτλο 21, Μέρος 133 του Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών, ο οποίος περιγράφει τα πρότυπα για το τυρί και τα συναφή τυροκομικά προϊόντα. Αυτά τα πρότυπα προσδιορίζουν την απαιτούμενη σύνθεση του τυριού ορού γάλακτος, συμπεριλαμβανομένης της υγρασίας και της περιεκτικότητάς του σε λιπαρά. Επιπλέον, οι παραγωγοί πρέπει να τηρούν τις Καλές Πρακτικές Παραγωγής (GMP) όπως καθορίζονται στον Τίτλο 21 του CFR, Μέρος 117, οι οποίες διασφαλίζουν ότι το τυρί ορού γάλακτος παράγεται σε

υγειονομικό περιβάλλον και είναι ασφαλές για κατανάλωση. Ο FDA επιβάλλει επίσης αυστηρές απαιτήσεις επισήμανσης σύμφωνα με τον Τίτλο CFR 21, Μέρος 101, απαιτώντας την ακριβή αναπαράσταση του περιεχομένου του προϊόντος και των διατροφικών πληροφοριών στην ετικέτα.

Ο έλεγχος της διασταυρούμενης μόλυνσης των νωπών τυριών ορού γάλακτος κατά την αποθήκευση απαιτεί τη χρήση αποτελεσματικών και βιώσιμων λύσεων για τη συντήρηση και την ασφάλεια του τυριού ορού γάλακτος. Εκτεταμένη μελέτη σχετικά με τις εξελίξεις στη συντήρηση τυριών με έμφαση στις «καθαρές ετικέτες» προέκυψε από την αυξανόμενη ζήτηση των πελατών για φρέσκα προϊόντα χωρίς συντηρητικά. Οι στρατηγικές τροφίμων χωρίς χημικά συντηρητικά ικανοποιούνται όταν χρησιμοποιείται συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) για την αύξηση της ασφάλειας του προϊόντος και την παράταση της διάρκειας ζωής. Το MAP είναι μια δημοφιλής τεχνική αποθήκευσης που παρατείνει τη διάρκεια ζωής και βελτιώνει την εμφάνιση των τροφίμων.

Η συμπερίληψη διαφορετικών βοτάνων και/ή εκχυλισμάτων φυτών και η πιθανή χρήση τους σε συνδυασμό με διάφορα υλικά συσκευασίας για την αύξηση της διάρκειας ζωής των τυριών ορού γάλακτος έχουν αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών στην επιστήμη της τεχνολογίας των τροφίμων. Λόγω των αισθητηριακών και αντιοξειδωτικών τους ιδιοτήτων, στα τυριά χρησιμοποιούνται συχνά θυμάρι, δεντρολίβανο και κύμινο.

Τα τυριά ορού γάλακτος έχουν υποβληθεί σε ποικίλες καινοτόμες επεξεργασίες τα τελευταία δέκα χρόνια σε μια προσπάθεια να βελτιώσουν τις λειτουργικές και αισθητηριακές τους ιδιότητες καθώς και να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής τους. Μια εναλλακτική μέθοδος αποθήκευσης του Requeijão, όπως προτείνεται από τους Duarte et al, περιλάμβανε την υποβολή του τυριού σε υπερβαρική αποθήκευση 100 MPa σε μεταβαλλόμενη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αυτό απέτρεψε τον σχηματισμό εντεροβακτηριδίων και ολικών αερόβιων μεσόφιλων βακτηρίων. Η Ricotta υποβλήθηκε σε θεραπεία με πλάσμα και παλμικό φως. Οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παράταση της διάρκειας ζωής του τυριού ήταν δυνατή και με τις δύο προσεγγίσεις. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση κάθε διαδικασίας που περιελάμβανε ομογενοποίηση μετά από δεύτερη θερμική επεξεργασία προκειμένου να αυξηθεί η διάρκεια ζωής του τυριού. Οι Tripaldi et al.

Διαπίστωσαν επίσης ότι το ομογενοποιημένο τυρί Ricotta από βουβαλίσιο τυρόγαλα είχε μεγαλύτερη διάρκεια ζωής από το κανονικό τυρί Ricotta.

**Πίνακας: Σύνθεση τυριών τυρογάλακτος και οδηγίες συντήρησης (ΕΦΕΤ,2012)**

<b>ΟΝΟΜΑ</b>	<b>ΜΥΖΗΘΡΑ(ΞΕΡΗ), ΑΝΘΟΤΥΡΟ, ΜΑΝΟΥΡΙ (ΠΟΠ)</b>		
<b>ΣΥΝΘΕΣΗ:</b>	<i>Αιγοπρόβειο ή αγελαδινό (μυζήθρα) τυρόγαλα, αιγοπρόβειο ή αγελαδινό γάλα (πρόσγαλα) ή/και προσθήκη κρέμας, αλάτι.</i>		
<b>ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ</b>			
	<b>ΜΥΖΗΘΡΑ</b>	<b>ΑΝΘΟΤΥΡΟ</b>	<b>ΜΑΝΟΥΡΙ</b>
Ενέργεια	366 Kcal/100gr	191 Kcal/100gr	374 Kcal/100gr
Πρωτεΐνες	20%	11%	10,5%
Λίπος	30%	19,5%	36%
Υγρασία (μέγιστη)	50%	70%	60%
NaCl (μέγιστη)	1,2%	1,2%	1,4%
Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού	70%	70%	70%
<b>ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ:</b>	<i>Ανάλογα με τον τύπο του τυριού χρησιμοποιείται αεροστεγής συσκευασία των 200 g, 1, 1,5, 2 kg.</i>		
<b>ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ:</b>	<i>Διατηρείται σε ψύξη (<math>\theta \leq 4^{\circ} C</math>).</i>		
<b>ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΝΟΜΗΣ:</b>	<i>Υπό ψύξη (<math>\theta \leq 4^{\circ} C</math>).</i>		
<b>ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΗΣΗΣ:</b>	<i>Τα τυριά τυρογάλακτος αποτελούν συνοδευτικό γεύματος και μέρος συνταγής μαγειρικής.</i>		
<b>ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ</b>	<b>ΜΥΖΗΘΡΑ</b>	<b>ΑΝΘΟΤΥΡΟ</b>	<b>ΜΑΝΟΥΡΙ</b>
	<i>Ένα έτος</i>	<i>30 ημέρες</i>	<i>90 ημέρες</i>

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup> ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ

Η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS, Next Generation Sequencing), επίσης γνωστή ως αλληλούχηση υψηλής απόδοσης (HTS, High Throughput Sequencing), έχει φέρει επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα επιτρέποντας ταχεία και ολοκληρωμένη ανάλυση του γενετικού υλικού. Αποτελεί έναν γενικό όρο που περιγράφει διάφορες σύγχρονες τεχνολογίες αλληλούχησης DNA. Αυτές οι τεχνολογίες επιτρέπουν τον γρήγορο και οικονομικό προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA και του RNA σε σύγκριση με την παραδοσιακή μέθοδο αλληλούχησης Sanger. Οι τεχνολογίες που ανήκουν στην αλληλούχηση νέας γενιάς περιλαμβάνουν την αλληλούχηση Illumina (Solexa), την αλληλούχηση Roche 454, και την αλληλούχηση πρωτονίων/PGM κ.α. (Park et al., 2023).

#### 3.1. Ιστορική αναδρομή

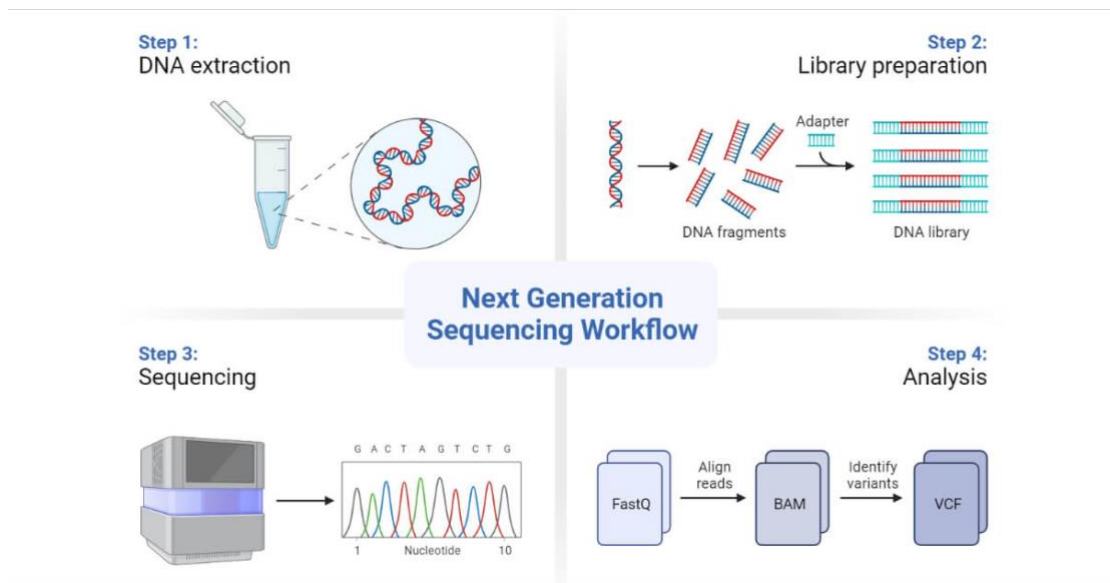
Η ιστορία της NGS ξεκινά με τις πρώιμες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας DNA, ιδιαίτερα την αλληλούχηση Sanger, που αναπτύχθηκε από τον Frederick Sanger το 1977. Η μέθοδος Sanger χρησιμοποίησε αναστολείς τερματισμού αλυσίδας για την αλληλουχία του DNA και παρέμεινε το χρυσό πρότυπο για πολλά χρόνια λόγω της ακρίβειάς του. Την ίδια εποχή, ο Allan Maxam και ο Walter Gilbert εισήγαγαν την αλληλούχηση Maxam-Gilbert, μια χημική μέθοδο που περιλαμβάνει την τροποποίηση και τη διάσπαση του DNA σε συγκεκριμένες βάσεις. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος έγινε λιγότερο δημοφιλής λόγω της πολυπλοκότητάς της και της χρήσης επικίνδυνων χημικών ουσιών (Hu et al., 2021).

Οι τεχνολογίες NGS διακρίνονται σε σύντομης και σε μακράς ανάγνωσης. Το κοινό χαρακτηριστικό των τεχνολογιών σύντομης ανάγνωσης είναι η μαζική αλληλούχηση βραχέων (250–800 bp), κλωνικά ενισχυμένων μορίων DNA που αλληλουχούνται παράλληλα. Η ροή εργασίας του NGS περιλαμβάνει προετοιμασία βιβλιοθήκης, αλληλουχία και ανάλυση δεδομένων. Η ανάπτυξη της δεύτερης γενιάς NGS ξεκίνησε με το 454 Pyrosequencing, που εισήχθη από το 454 Life Sciences το 2005. Αυτή η τεχνολογία χρησιμοποίησε την ανίχνευση πυροφωσφορικών για αλληλούχηση με σύνθεση και επέτρεψε μεγαλύτερα μήκη ανάγνωσης σε σύγκριση με προηγούμενες μεθόδους. Το 2006, η Illumina, Inc. ανέπτυξε την τεχνολογία αλληλουχίας με σύνθεση

(SBS), η οποία έγινε η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πλατφόρμα NGS λόγω της υψηλής απόδοσης, της ακρίβειας και της ευελιξίας της. Αυτή η μέθοδος περιελάμβανε κατακερματισμό του DNA, προσάρτηση προσαρμογέων και σύνθεση συμπληρωματικών κλώνων ενώ ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων σημασμένων με φθορισμό. Το 2007, η Applied Biosystems ανέπτυξε την αλληλουχία SOLiD, χρησιμοποιώντας αλληλούχιση με σύνδεση. Αν και το SOLiD παρείχε υψηλή ακρίβεια, ήταν λιγότερο δημοφιλές λόγω της πολυπλοκότητάς του και των μικρότερων μηκών ανάγνωσης. Η Ion Torrent Systems εισήγαγε το Ion Torrent Sequencing το 2010, το οποίο μέτρησε τα ιόντα υδρογόνου που απελευθερώθηκαν κατά τη σύνθεση του DNA. Αυτή η τεχνολογία προσέφερε μια ταχύτερη και πιο προσιτή εναλλακτική λύση αλλά με μικρότερα μήκη ανάγνωσης (Akintunde et al., 2023).

Ο τομέας της ιατρικής ακριβείας έχει ωφεληθεί πολύ από την ταχεία πρόοδο της τεχνολογίας αλληλουχίας DNA που διαβάζεται μεγαλύτερα τμήματα. Οι τεχνολογίες μακράς ανάγνωσης είναι κατάλληλες για κλινικές εφαρμογές στη μοριακή διάγνωση και την επιλογή φαρμάκων, επειδή μπορούν να αξιολογήσουν τεράστιες και περίπλοκες τομές του γονιδιώματος. Οι τεχνολογίες μακράς ανάγνωσης, έχουν την ικανότητα να παράγουν αλληλουχίες μεγαλύτερες από 10 kb απευθείας από το φυσικό DNA, σε αντίθεση με τις μεθόδους σύντομης ανάγνωσης. Αν και οι αρχικές εκδόσεις αυτών των τεχνολογιών ήταν γεμάτες λάθη, οι πιο πρόσφατες προσαρμογές και εξελίξεις κατέστησαν δυνατή την επίτευξη πολύ μεγαλύτερης ακρίβειας και παρουσίασαν ενδιαφέρουσες ευκαιρίες για την αλληλούχιση μεγάλων μορίων DNA, όπως για τον εντοπισμό γενετικών διαταραχών (Hu et al., 2021). Ονομάζονται και μέθοδοι τρίτης γενιάς και κύριο εκπρόσωποι είναι η Oxford Nanopore Technologies και η Pacific Biosciences που προσπαθούν να διατηρήσουν το κόστος χαμηλό ενώ ενισχύουν την ακρίβεια, την απόδοση και την κινητικότητα των τεχνολογιών αλληλουχίας μακράς ανάγνωσης (Oehler et al., 2023).

Στην ακόλουθη εικόνα δίνονται το διάγραμμα ροής της τεχνολογίας NGS.



**Εικόνα 1.** Βασικά στάδια αλληλούχισης με τις τεχνολογίες NGS (<https://microbenotes.com/next-generation-sequencing-ngs>)

## 3.2. Αλληλούχιση σύντομης ανάγνωσης

### 3.2.1. Πυροαλληλούχιση

Η τεχνολογία 454 Roche NGS, γνωστή ως πυροαλληλούχιση, έφερε επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα με την προσέγγιση αλληλουχίας προς σύνθεση. Η διαδικασία ξεκινά με την προετοιμασία της βιβλιοθήκης, όπου τα δείγματα DNA κατακερματίζονται και οι προσαρμογείς συνδέονται στα άκρα. Αυτά τα θραύσματα στη συνέχεια συνδέονται με σφαιρίδια και υποβάλλονται σε PCR γαλακτώματος (emPCR), δημιουργώντας μικροαντιδραστήρια όπου ενισχύονται μεμονωμένα θραύσματα DNA. Μετά την ενίσχυση, τα σφαιρίδια τοποθετούνται σε ένα ειδικό πιάτο για αλληλούχιση. Κατά τη διάρκεια της πυρο-αλληλούχισης η πολυμεράση DNA προσθέτει νουκλεοτίδια στον κλώνο του DNA, απελευθερώνοντας πυροφωσφορικό με κάθε ενσωμάτωση. Αυτή η απελευθέρωση πυροδοτεί μια βιοχημική αντίδραση που παράγει φως, το οποίο ανιχνεύεται από μια κάμερα. Η ένταση φωτός υποδεικνύει το συγκεκριμένο νουκλεοτίδιο που προστέθηκε, επιτρέποντας την αλληλούχιση σε πραγματικό χρόνο (Persing, 2016).

Η ικανότητα παραγωγής εκατοντάδων χιλιάδων αναγνώσεων ακολουθίας σε μία μόνο εκτέλεση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τάξεις μεγέθους μεγαλύτερα δεδομένα πληροφοριών ακολουθίας, είναι ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας

μαζικής παράλληλης πυροαλληλούχισης έναντι της μεθόδου αλληλουχίας Sanger. Επιπλέον, η τεχνική έχει πολύ χαμηλότερο κόστος ανά βάση από την προσέγγιση Sanger και αυτό συνέβαλε στην ευρεία χρήση των τεχνικών προσδιορισμού αλληλουχίας DNA. Τέλος, αποφεύγει επίσης τις προκαταλήψεις που σχετίζονται με τη διαδικασία της κλωνοποίησης, κάτι που είναι ένα άλλο όφελος. Χρησιμοποιώντας τη στρατηγική πολυπλεξίας γραμμωτού κώδικα, η οποία περιλαμβάνει την ενσωμάτωση μοναδικών αλληλουχιών σε εκκινητές και την παραγωγή αμπλικονίων με γραμμωτό κώδικα, αλληλουχίες από πολλά δείγματα μπορούν να αναγνωριστούν σε μία μόνο σειρά της μεθόδου πυροαλληλούχισης μειώνοντας έτσι και το κόστος (Tringe & Hugenholtz, 2008)

Η μέθοδος πυροαλληλούχισης έχει ένα εγγενές μειονέκτημα στο ότι μπορεί να οδηγήσει σε σφάλματα προσδιορισμού αλληλουχίας όταν ανιχνεύονται μακροσκελή ομοπολυμερή (επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια). Η πλειονότητα των πυροαλληλουχιών είχε μηδενικά ή πολύ λίγα λάθη, αλλά ορισμένες θα μπορούσαν να έχουν αρκετά σφάλματα για να θεωρηθούν ως ασυνήθιστες λειτουργικές ταξινομικές μονάδες, οι οποίες θα διόγκωναν τις εκτιμήσεις του πλούτου. Έχουν τεθεί πολλές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση αυτών των ήχων. Επιπλέον, τα σύντομα μήκη ανάγνωσης που παράγονται από την τεχνολογία NGS θα μπορούσαν ενδεχομένως να είναι ένα μειονέκτημα εάν ο στόχος είναι η αναγνώριση μικροοργανισμών. Επιπλέον, η ακριβής ταυτοποίηση ορισμένων βακτηριακών ειδών ή και την περιγραφή ενός νέου είδους εξακολουθεί να απαιτεί τον προσδιορισμό της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδίου 16S rRNA των 1.500 bp (Clarridge, 2004)

### **3.2.2. Αλληλούχιση Illumina**

Η αλληλούχιση Illumina βασίζεται στην αρχή της μαζικά παράλληλης αλληλούχισης ανά σύνθεση, η οποία έφερε επανάσταση στον τομέα της γονιδιωματικής με την υψηλή απόδοση και την ακρίβειά της. Η διαδικασία προσδιορισμού της αλληλουχίας ξεκινά με την προετοιμασία ενός δείγματος DNA, τυπικά με τον τεμαχισμό του σε τμήματα περίπου 200 έως 600 ζευγών βάσεων. Στη συνέχεια, οι προσαρμογείς συνδέονται σε αυτά τα θραύσματα, επιτρέποντάς τους να συνδεθούν σε μια επιφάνεια κυψέλης ροής όπου λαμβάνει χώρα η αλληλούχιση.



Η τεχνική Illumina βασίζεται στη μέθοδο προσδιορισμού αλληλουχίας με σύνθεση, όπου αυτά τα θραύσματα DNA υφίστανται ενίσχυση στην επιφάνεια του κυττάρου ροής. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, κάθε θραύσμα ενισχύεται κλωνικά σε ομάδες πανομοιότυπων θραυσμάτων. Η ίδια η διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας περιλαμβάνει τη διαδοχική προσθήκη επισημασμένων με φθορισμό νουκλεοτιδίων (A, T, C, G) σε αυτές τις συστάδες. Είναι σημαντικό ότι κάθε τύπος νουκλεοτιδίου επισημαίνεται με διαφορετικό φθοροφόρο που εκπέμπει φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος κατά την ενσωμάτωσή του στον αναπτυσσόμενο κλώνο DNA. Καθώς προστίθενται νουκλεοτίδια, μια κάμερα συλλαμβάνει εικόνες του κυττάρου ροής, καταγράφοντας τα φθορίζοντα σήματα που εκπέμπονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου. Αυτές οι εικόνες υποβάλλονται σε επεξεργασία μέσω εξελιγμένων αλγορίθμων για να προσδιοριστεί ποιο νουκλεοτίδιο ενσωματώθηκε σε κάθε θέση στο θραύσμα DNA. Τα δεδομένα που δημιουργούνται από τις σειρές αλληλουχίας της Illumina υποβάλλονται σε εκτενή ανάλυση βιοπληροφορικής για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, τη διόρθωση σφαλμάτων αλληλουχίας και τη συναρμολόγηση των αναγνώσεων σε ένα ολοκληρωμένο γονιδίωμα ή άλλες γενετικές αλληλουχίες (Buermans & Den Dunnen, 2014).

Η τεχνική προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας υψηλής απόδοσης, που επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση εκατομμυρίων θραυσμάτων DNA σε ένα κύτταρο μεμονωμένης ροής. Αυτή η επεκτασιμότητα επιτρέπει στους ερευνητές να αλληλουχούν αποτελεσματικά ολόκληρα γονιδιώματα, μεταγραφώματα ή συγκεκριμένες γενετικές περιοχές, διευκολύνοντας τις ανακαλύψεις σε τομείς όπως η γενετική παραλλαγή, η γενετική ασθενειών και η εξελικτική βιολογία. Η ακρίβεια της τεχνολογίας είναι επίσης αξιοσημείωτη, ιδιαίτερα σε εφαρμογές σύντομης ανάγνωσης αλληλουχίας, καθιστώντας την απαραίτητη για τον εντοπισμό γενετικών μεταλλάξεων, την κατανόηση της γενετικής ποικιλότητας και τη μελέτη πολύπλοκων ασθενειών (Hert et al., 2008).

Ένας σημαντικός περιορισμός της μεθόδου είναι τα μικρά μήκη ανάγνωσης, συνήθως μέχρι 300 ζεύγη βάσεων, τα οποία περιπλέκουν τη συναρμολόγηση των γονιδιωμάτων με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή πολύπλοκες δομικές παραλλαγές. Το αρχικό κόστος για τη δημιουργία μιας πλατφόρμας Illumina είναι

υψηλό, και απαιτεί σημαντική επένδυση στο όργανο και την υποδομή αλληλουχίας, καθιστώντας την λιγότερο προσβάσιμη σε μικρότερα εργαστήρια. Η διαδικασία προετοιμασίας της βιβλιοθήκης είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα, και περιλαμβάνει πολλαπλά βήματα που μπορούν να εισάγουν μεταβλητότητα και πιθανά σφάλματα. Η ενίσχυση PCR κατά την προετοιμασία της βιβλιοθήκης μπορεί επίσης να εισάγει προκαταλήψεις, που οδηγεί σε ανομοιόμορφη κάλυψη και επηρεάζει την ακρίβεια της. Επιπλέον, η αλληλούχιση Illumina δημιουργεί μεγάλους όγκους δεδομένων, απαιτώντας σημαντικούς υπολογιστικούς πόρους για αποθήκευση, επεξεργασία και ανάλυση, κάτι που μπορεί να είναι δύσκολο για εργαστήρια χωρίς προηγμένη υποδομή βιοπληροφορικής (Kircher & Kelso, 2010).

### 3.2.3. Ion Torrent Sequencing

Η αλληλουχία ιόντων Torrent είναι μια τεχνολογία αιχμής που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό NGS που λειτουργεί με βάση μια μοναδική αρχή που περιλαμβάνει την ανίχνευση ιόντων υδρογόνου που απελευθερώνονται κατά τη σύνθεση του DNA. Η διαδικασία ξεκινά με την παρασκευή θραυσμάτων DNA που συνδέονται με σφαιρίδια ή μικροσωματίδια, καθένα από τα οποία περιέχεται σε μεμονωμένα φρεάτια σε ένα τσιπ ημιαγωγού. Αυτά τα θραύσματα DNA χρησιμεύουν ως εκμαγεία για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας.

Κατά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας με σύνθεση, τα νουκλεοτίδια (A, T, C, G) ρέουν διαδοχικά πάνω από το τσιπ. Καθώς κάθε νουκλεοτίδιο συμπληρωματικό προς τον κλώνο του εκμαγείου ενσωματώνεται στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA, ένα ιόν υδρογόνου απελευθερώνεται ως υποπροϊόν. Αυτή η απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου προκαλεί μια τοπική αλλαγή στο pH μέσα στο φρεάτιο. Η βασική καινοτομία της αλληλουχίας Ion Torrent έγκειται στην ανίχνευση αυτών των αλλαγών του pH. Κάτω από κάθε φρεάτιο του τσιπ ημιαγωγού, υπάρχουν ευαίσθητα σε ιόντα τρανζίστορ φαινομένου πεδίου (ISFET) που ανιχνεύουν μικρές διακυμάνσεις του pH που προκύπτουν από την απελευθέρωση ιόντων υδρογόνου. Αυτές οι αλλαγές του pH είναι ευθέως ανάλογες με την νουκλεοτιδική αλληλουχία που συντίθεται σε πραγματικό χρόνο (Lahens et al., 2017).

Καθώς η διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας συνεχίζεται, το όργανο Ion Torrent παρακολουθεί τις αλλαγές του pH σε όλα τα φρεάτια ταυτόχρονα. Η σειρά και ο χρονισμός αυτών των αλλαγών του pH καταγράφονται και μεταφράζονται σε ψηφιακή ανάγνωση, που αντιπροσωπεύει την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων κατά μήκος του εκμαγείου DNA. Αυτά τα ακατέργαστα δεδομένα αλληλουχίας στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία μέσω εξελιγμένων αλγορίθμων βιοπληροφορικής για την ανακατασκευή της αρχικής αλληλουχίας DNA.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου περιλαμβάνουν την ταχύτητά της, καθώς παρακάμπτει την ανάγκη για φθορίζουσες ετικέτες ή μεθόδους οπτικής ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται σε άλλες τεχνολογίες αλληλούχισης. Αυτό επιτρέπει τον γρήγορο προσδιορισμό της αλληλουχίας των δειγμάτων DNA, καθιστώντας το Ion Torrent ιδιαίτερα κατάλληλο για εφαρμογές που απαιτούν γρήγορους χρόνους ανάκαμψης, όπως η στοχευμένη αλληλουχία γονιδίων, η μικροβιακή γονιδιωματική και η κλινική διάγνωση. Επιπλέον, η αλληλουχία ιόντων Torrent είναι γνωστή για την επεκτασιμότητα και τη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, καθιστώντας την μια προτιμώμενη επιλογή για διάφορα ερευνητικά και κλινικά εργαστήρια παγκοσμίως που αναζητούν αποτελεσματική και ακριβή γονιδιωματική ανάλυση (Pervez et al., 2022).

### **3.3. Αλληλούχιση μακράς ανάγνωσης**

Οι τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας τρίτης γενιάς, όπως η αλληλουχία μεμονωμένου μορίου σε πραγματικό χρόνο (SMRT) της Pacific Biosciences και η αλληλουχία νανοπόρων της Oxford Nanopore Technologies, επέτρεψαν τον προσδιορισμό αλληλουχίας σε πραγματικό χρόνο μεμονωμένων μορίων DNA. Αυτές οι μέθοδοι παρείχαν μεγαλύτερα μήκη ανάγνωσης της τάξης των 10 kb απευθείας από ακατέργαστο DNA και την ικανότητα αλληλουχίας πολύπλοκων γονιδιωματικών περιοχών. Αν και οι αρχικές εκδόσεις αυτών των τεχνολογιών ήταν γεμάτες λάθη, οι πιο πρόσφατες προσαρμογές και εξελίξεις κατέστησαν δυνατή την επίτευξη πολύ μεγαλύτερης ακρίβειας και παρουσίασαν ενδιαφέρουσες ευκαιρίες για την αλληλούχιση μεγάλων μορίων DNA, όπως για τον εντοπισμό γενετικών διαταραχών

### 3.3.1. Αλληλούχιση PacBio

Η αλληλούχιση PacBio, λειτουργεί με μια θεμελιωδώς διαφορετική αρχή σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνολογίες αλληλούχισης. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας PacBio περιλαμβάνει την παρατήρηση της ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων σημασμένων με φθορισμό από μια πολυμεράση DNA σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η διαδικασία λαμβάνει χώρα μέσα σε μικροσκοπικά φρεάτια που ονομάζονται κυματοδηγοί μηδενικής λειτουργίας (ZMWs), όπου κάθε ZMW περιορίζει την παρατήρηση σε έναν μικρό όγκο, επιτρέποντας την ανίχνευση ενός μορίου. Καθώς η DNA πολυμεράση ενσωματώνει νουκλεοτίδια συμπληρωματικά προς τον κλώνο DNA του εκμαγείου, το φθορίζον σήμα καταγράφεται και αναλύεται. Αυτή η παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο επιτρέπει τη συνεχή αλληλούχιση μεμονωμένων μορίων DNA, με αποτέλεσμα μεγάλες αναγνώσεις που μπορούν να εκτείνονται σε αρκετές χιλιάδες βάσεις (Rhoads, & Au, 2015).

Η τεχνολογία PacBio μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για προσδιορισμό αλληλουχίας RNA με την τεχνική Iso-Seq. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Iso-Seq, ολόκληρα μετάγραφα συμπεριλαμβανομένων οποιωνδήποτε ισομορφών, μπορούν να αλληλουχηθούν. Σε αυτή τη μέθοδο, το RNA μετατρέπεται σε cDNA και η αλληλουχία HiFi χρησιμοποιείται για τη δημιουργία δεδομένων αλληλουχίας. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται αλληλουχίες αναφοράς για την αναγνώριση ισομορφών μεταγραφής (Hu et al., 2021).

Συγκρίνοντας την αλληλούχιση PacBio με άλλες τεχνολογίες αλληλούχισης, υπάρχουν ορισμένα αξιοσημείωτα οφέλη. Το κύριο πλεονέκτημα έγκειται στην ικανότητά του να παράγει εξαιρετικά μεγάλες μετρήσεις, που μερικές φορές ξεπερνούν τα 10.000 ζεύγη βάσεων. Πολύπλοκες γονιδιωματικές περιοχές που είναι δύσκολο να επιλυθούν οι τεχνολογίες σύντομης ανάγνωσης, τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, δομικές παραλλαγές και περιοχές με υψηλή περιεκτικότητα GC, μπορούν να επιλυθούν με μεγάλο όφελος από αυτές τις δυνατότητες μακράς ανάγνωσης. Επιπλέον, η αλληλουχία PacBio εξαλείφει την ανάγκη για στάδια ενίσχυσης PCR, γεγονός που μειώνει την πιθανότητα προκατάληψης και τεχνουργημάτων ενίσχυσης. Η επιγενετική, μια μέθοδος που ανιχνεύει τις αλλαγές βάσης με μεγάλη ακρίβεια, προσφέρει άμεσες πληροφορίες που σχετίζονται με την αλληλουχία σχετικά με τη μεθυλίωση του DNA και άλλες

τροποποιήσεις. Ο εξοπλισμός PacBio είναι επίσης χρήσιμος για εφαρμογές που πρέπει να παράγουν γρήγορα μακροχρόνιες μετρήσεις υψηλής ποιότητας, λόγω των σχετικά γρήγορων χρόνων διεκπεραίωσής τους (Nakano et al., 2017).

Ωστόσο, η αλληλούχιση PacBio έχει πολλά μειονεκτήματα. Το αυξημένο ποσοστό λάθους του σε σύγκριση με μεθόδους σύντομης ανάγνωσης, όπως η αλληλούχιση Illumina, είχε θεωρήσει προηγουμένως έναν σημαντικό περιορισμό. Οι μετρήσεις του PacBio εξακολουθούν να παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά σφάλματος, ακόμη και με πρόσφατες σημαντικές βελτιώσεις στη χημεία και την επεξεργασία δεδομένων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε περιοχές ομοπολυμερών όπου είναι δύσκολο να διαχωριστούν διαδοχικές πανομοιότυπες βάσεις. Το αυξημένο κόστος ανά βάση σε σύγκριση με τις μεθόδους αλληλουχίας σύντομης ανάγνωσης είναι ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη. Αυτό μπορεί να είναι ένα εμπόδιο για έργα γονιδιωματος μεγάλης κλίμακας ή έρευνα βαθιάς κάλυψης. Επιπλέον, ο εξοπλισμός PacBio είχε ιστορικά χαμηλότερη απόδοση από ορισμένες άλλες πλατφόρμες αλληλουχίας. Ωστόσο, με την εισαγωγή νεότερων γενεών οργάνων, πολλές προκλήσεις έχουν ξεπεραστεί (Hu et al., 2021; Ari & Arıkan, 2016).

### **3.3.2. Αλληλούχιση Nanopore**

Η ONT, η οποία χρησιμοποιεί τις έννοιες της ανίχνευσης νανοπόρου, είναι μια άλλη σημαντική τεχνική στον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA. Η αλληλουχία ONT περιστρέφεται γύρω από τον νανοπόρο, ο οποίος είναι μια μικροσκοπική οπή που εισάγεται σε μια συνθετική μεμβράνη. Τα μονόκλιωνα μόρια DNA έχουν σχεδιαστεί για να μπορούν να περνούν από το κέντρο αυτών των νανοπόρων και κατά την είσοδο τους προκαλούν διακριτές διακυμάνσεις στο ηλεκτρικό ρεύμα και στιγμιαία εμποδίζουν τη διέλευση ιόντων μέσω της μεμβράνης. Το πρώτο στάδιο στη διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας είναι η προετοιμασία ενός δείγματος DNA, το οποίο συνήθως χωρίζεται σε μικρότερα τμήματα και περνά από διαδικασίες στη διαδικασία προετοιμασίας της βιβλιοθήκης που περιλαμβάνουν προσαρμογείς σύνδεσης που βοηθούν στη μετατόπιση νανοπόρου. Καθώς κάθε κλώνος DNA διέρχεται μέσω του νανοπόρου, η μοναδική ακολουθία βάσεων (A, T, C, G) κατά το μήκος της ρυθμίζει το ιοντικό ρεύμα που ρέει μέσω του πόρου. Αυτές οι αλλαγές στο

ρεύμα ανιχνεύονται από εξειδικευμένους αισθητήρες και ηλεκτρονικά, που τα μετατρέπουν σε ψηφιακά σήματα σε πραγματικό χρόνο. Είναι σημαντικό ότι η αλληλουχία ONT επιτρέπει την άμεση ανάγνωση αλληλουχιών DNA χωρίς την ανάγκη προηγούμενων βημάτων ενίσχυσης ή κατακερματισμού, τα οποία μπορούν να εισάγουν μεροληψία ή σφάλματα σε άλλες μεθόδους προσδιορισμού αλληλουχίας.

Τα συλλαμβανόμενα ηλεκτρικά σήματα στη συνέχεια υποβάλλονται σε επεξεργασία μέσω εξελιγμένων αλγορίθμων και λογισμικού για την αποκωδικοποίηση της ακολουθίας των βάσεων, μια διαδικασία γνωστή ως κλήση βάσης.

Οι πρόοδοι στην τεχνολογία νανοπόρων έχουν βελτιώσει σημαντικά την ακρίβεια και την ταχύτητα, επιτρέποντας στο ONT να παράγει μεγάλες αναγνώσεις που εκτείνονται από χιλιάδες έως δεκάδες χιλιάδες νουκλεοτίδια. Αυτή η ικανότητα είναι ιδιαίτερα πλεονεκτική για εφαρμογές όπως η *de novo* συγκρότηση γονιδιώματος, όπου οι μακρές αναγνώσεις βοηθούν στην επίλυση πολύπλοκων γονιδιωματικών περιοχών και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που αποτελούν πρόκληση για τεχνολογίες σύντομης ανάγνωσης αλληλουχίας. Η φορητότητα των συσκευών ONT, όπως το MinION και το GridION, ενισχύει την ευελιξία τους, επιτρέποντας την εκτέλεση αλληλούχησης σε διάφορες ρυθμίσεις, από εργαστήρια έως απομακρυσμένες τοποθεσίες πεδίου. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει φέρει επανάσταση στη γονιδιωματική έρευνα επιτρέποντας μελέτες σε μη παραδοσιακά περιβάλλοντα και υποεξυπηρετούμενες περιοχές όπου η πρόσβαση στην υποδομή προσδιορισμού αλληλουχίας είναι περιορισμένη.

Ωστόσο, η αλληλούχηση ONT συνοδεύεται από προκλήσεις που πρέπει να εξετάσουν οι ερευνητές. Ένα αξιοσημείωτο μειονέκτημα είναι τα υψηλότερα ποσοστά σφάλματος σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνολογίες σύντομης ανάγνωσης αλληλουχίας. Τα σφάλματα, ειδικά σε ομοπολυμερικές περιοχές όπου διαδοχικές ίδιες βάσεις είναι δύσκολο να επιλυθούν με ακρίβεια, έχουν προκαλέσει ανησυχία. Ενώ οι βελτιώσεις στη χημεία και στους αλγόριθμους βασικής κλήσης έχουν μετριάσει ορισμένα από αυτά τα ζητήματα, τα ποσοστά σφάλματος παραμένουν υψηλότερα από αυτά των τεχνολογιών όπως η αλληλουχία Illumina, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα που απαιτούν υψηλή ακρίβεια.

Το κόστος είναι ένα άλλο ζήτημα, καθώς το κόστος αλληλουχίας ανά βάση του ONT μπορεί να είναι υψηλότερο από αυτό των τεχνολογιών σύντομης ανάγνωσης. Αυτό μπορεί να περιορίσει την επεκτασιμότητα του για έργα γονιδιώματος μεγάλης κλίμακας που απαιτούν βαθιά κάλυψη. Επιπλέον, η πολυπλοκότητα της ανάλυσης των δεδομένων αλληλουχίας ONT θέτει μια πρόκληση, απαιτώντας εξειδικευμένη τεχνογνωσία στη βιοπληροφορική και υπολογιστικούς πόρους για την ερμηνεία των δεδομένων και την αξιολόγηση της ποιότητας. Παράγοντες όπως η ποιότητα του DNA, τα πρωτόκολλα προετοιμασίας της βιβλιοθήκης και οι περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν επίσης να επηρεάσουν την απόδοση της αλληλουχίας ONT, επηρεάζοντας τη συνέπεια και την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

### **3.4. Άλλες τεχνολογίες 4ης γενιάς**

Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία προσδιορισμού αλληλουχίας δεύτερης γενιάς, οι συσκευές προσδιορισμού αλληλουχίας τέταρτης γενιάς έχουν ενεργοποιήσει την επί τόπου αλληλούχιση σε σταθερούς ιστούς και κύτταρα (Mignardi και Nilsson, 2014). Οι βασικές ιδέες αυτής της δημιουργίας αλληλουχίας δόθηκαν από την εργασία των Ke et al. (2013) σχετικά με το προφίλ έκφρασης πολλαπλών γονιδίων και την ανάλυση σημειακών μεταλλάξεων σε τομές ιστού καρκίνου του μαστού με χρήση αλληλούχισης *in situ*. Η προσέγγιση αυτής της μελέτης περιλαμβάνει τη χρήση ανιχνευτών λουκέτων για την περιτύλιξη μικρών στόχων και τη χρήση δραστηριοτήτων λιγάσης και πολυμεράσης για την πλήρωση των κενών μεταξύ των βραχιόνων των ανιχνευτών. Μετά από αυτό, η κλωνική ενίσχυση πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ενίσχυση κυλιόμενου κύκλου και το τελευταίο βήμα είναι η εξαρτώμενη από τη λιγάση αλληλούχιση.

Η προσέγγιση είναι ιδιαίτερα πλεονεκτική για εφαρμογές όπου η ανάλυση ανάλυσης ενός κυττάρου των πληθυσμών κυττάρων μπορεί να αποφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα. Λόγω αυτής της μεθόδου προσδιορισμού προφίλ, η *in situ* αλληλούχιση αποδίδει πιο λεπτομερή ευρήματα και επιτρέπει τη διαλογή ολόκληρου του κυτταρικού πληθυσμού σε ανάλυση ενός μόνο κυττάρου, σε σύγκριση με την αλληλούχιση ενός κυττάρου. Από την άλλη πλευρά, προκειμένου να ενισχυθεί η παραγωγικότητα και να ενθαρρυνθεί η χρήση αυτών των τεχνικών, πρέπει να

επιλυθούν τα ζητήματα της τυποποίησης, της οικονομικής προσιτότητας, της βιωσιμότητας και της πλήρους ενοποίησης με τα σημερινά συστήματα αλληλουχίας. Ωστόσο, δεδομένου του γρήγορου ρυθμού προόδου στα συστήματα NGS, φαίνεται ότι αυτά τα ζητήματα μπορούν να επιλυθούν γρήγορα (Ari και Arikan, 2016).

### 3.5. Εφαρμογές

Η χρήση της τεχνολογίας NGS και τεχνικών, όπως η αλληλούχηση του αμπλικονίου (αλληλουχία ενισχυμένων γονιδίων ενδιαφέροντος) επέτρεψαν την ανάλυση μεγάλων ποσοτήτων διαφορετικού περιβαλλοντικού DNA και έχουν εξαλείψει σε μεγάλο βαθμό τις προκλήσεις που σχετίζονται με την καλλιέργεια και τη μικροσκοπική ταυτοποίηση σε αυτό το πλαίσιο. Μέχρι τώρα χρησιμοποιούνται δύο μέθοδοι για τη μελέτη μικροβιακών κοινοτήτων χρησιμοποιώντας αλληλουχία υψηλής απόδοσης:

- i. μελέτες γονιδίων δεικτών και
- ii. μεταγονιδιωμιακή ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS, Whole Genome Sequencing).

Η WGS στοχεύει στην αλληλούχηση όλων των γονιδιωμάτων που υπάρχουν σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα για την ανάλυση της βιοποικιλότητας και των λειτουργικών δυνατοτήτων της μικροβιακής κοινότητας που μελετήθηκε. Καθώς ανακτάται ολόκληρο το γενετικό υλικό ενός δείγματος, είναι δυνατό να χαρακτηριστεί η πλήρης ποικιλομορφία ενός οικοτόπου, συμπεριλαμβανομένων των αρχαίων, βακτηρίων, ευκαρυωτών, ιών και πλασμιδίων, καθώς και η περιεκτικότητά του σε γονίδια.

Αντίθετα, οι αναλύσεις γονιδίων δεικτών βασίζονται στον προσδιορισμό της αλληλουχίας μιας ειδικής για το γονίδιο περιοχής για να αποκαλυφθεί η ποικιλομορφία και η σύνθεση συγκεκριμένων ταξινομικών ομάδων που υπάρχουν σε ένα περιβαλλοντικό δείγμα. Τα κύρια γονίδια-δείκτες που χρησιμοποιούνται στη μικροβιακή οικολογία είναι το γονίδιο 16S rRNA (για την ανάλυση της παρουσίας αρχαίων και βακτηρίων), η περιοχή εσωτερικού μεταγραφόμενου διαχωριστή (ITS, internal transcribed spacer) (για τον χαρακτηρισμό της σύνθεσης της μυκητιακής κοινότητας) και 18S rRNA (για αναφορά της εμφάνισης ευκαρυωτών) (Pérez-Cobas et al., 2020).



Μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές ανεξάρτητες από καλλιέργεια για την παραδοσιακή διερεύνηση του μικροβιώματος των τροφίμων είναι η αλληλούχιση του 16S rRNA. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο γονίδιο, το 16S rRNA, προσφέρει πληροφορίες σχετικά με τη βακτηριακή σύνθεση των δειγμάτων (συνήθως μέχρι το επίπεδο του γένους). Η εξαιρετικά διατηρημένη αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA αποτελείται από εννέα μεταβλητές τομές και έχει μέγεθος 1500 bp. Η αλληλούχιση Sanger χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου. Για να γίνει αυτό, ήταν απαραίτητο να κλωνοποιηθούν γονίδια, να παραχθεί ένα περιορισμένο βάθος δείγματος με μεγάλο κόστος και εργασία, και να δημιουργηθούν και να συγκεντρωθούν δύο έως τρεις αναγνώσεις ανά κλώνο. Ωστόσο, επειδή η κοινώς χρησιμοποιούμενη τεχνολογία αλληλουχίας Illumina αποδίδει σύντομες αλληλουχίες ( $\leq 300$  βάσεις), η μεγάλη πλειονότητα των μελετών τώρα αναλύει την αλληλουχία μόνο ενός τμήματος του γονιδίου. Σήμερα, τόσο οι πλατφόρμες προσδιορισμού αλληλουχίας PacBio όσο και Oxford Nanopore είναι σε θέση να παράγουν τακτικά αναγνώσεις άνω των 1500 bp και η αλληλουχία υψηλής απόδοσης του πλήρους γονιδίου 16S γίνεται ολοένα και πιο διαδεδομένη (Johnson et al., 2019).

Η NGS του γονιδίου 16S rRNA, περιλαμβάνει την απομόνωση και την επακόλουθη ενίσχυση της αλληλουχίας μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδίου 16S rRNA. Οι παραγόμενες αλληλουχίες στη συνέχεια ταυτοποιούνται με σύγκριση με αλληλουχίες γονιδίου αναφοράς που είναι προσβάσιμες σε δημόσιες βάσεις δεδομένων. Τα κύρια πλεονεκτήματα χρήσης αυτού του γονιδίου είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παράλληλη αλληλουχία εκατοντάδων δειγμάτων ταυτόχρονα και τη λήψη αποτελεσμάτων την ίδια ημέρα που ελήφθη το δείγμα. Επίσης, δεν εξαρτάται από το εάν τα βακτήρια σε ένα δείγμα είναι καλλιεργήσιμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της σχετικής αφθονίας όλων των βακτηρίων στο δείγμα (Woo et al., 2008).

Το γονίδιο 16S rRNA, το οποίο βρίσκεται στα περισσότερα βακτήρια, αποτελείται από εννέα υπερμεταβλητές περιοχές που περιβάλλονται από διατηρημένες αλληλουχίες (Neefs et al., 1993). Έχουν δημιουργηθεί γενικοί εκκινητές PCR που ενισχύουν την αλληλουχία των υπερμεταβλητών τόπων προκειμένου να προσδιορίσουν την αντιστοιχισμένη ταξινόμηση των ειδών βακτηρίων. Μια πρόκληση σε αυτήν την προσέγγιση σχετίζεται με την επιλογή εννέα

υπερμεταβλητών περιοχών (V1-V9) που περιέχονται στο γονίδιο 16S rRNA. Η επιλογή της υπερμεταβλητής περιοχής για την αλληλουχία 16S rRNA δεν εξαρτάται από το περιβάλλον του δείγματος αλλά κυρίως από δημοσιευμένα ή εσωτερικά σχεδιασμένα πρωτόκολλα. Πολλοί συγγραφείς έχουν προτιμήσει διαφορετικές υπερμεταβλητές περιοχές, όπως V1/V2/V4, V2/V3/V4, V2/V4 και V2/V3 (Cao et al., 2017).

Ενώ η αλληλούχηση των πιο μεταβλητών τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA μπορεί να δώσει μεγαλύτερη ακρίβεια για την κατηγοριοποίηση των αλληλουχιών στα επίπεδα του γένους και των ειδών σε βακτήρια και αρχαία η αλληλούχηση των πιο συντηρημένων περιοχών μπορεί να επιλύσει μόνο υψηλότερα επίπεδα ταξινόμησης. Για αυτό το λόγο κρίνεται και ζωτικής σημασίας να αξιολογηθεί εάν η επιλεγμένη περιοχή 16S rRNA είναι κατάλληλη για την περιοχή μελέτης ενδιαφέροντος, καθώς διάφορα μεταβλητά τμήματα του γονιδίου μπορεί να ωθούνται προς διαφορετικά taxa38 και να ευνοούνται για διαφορετικά οικοσυστήματα (Cameron, et al., 2021).

Ωστόσο, η τεχνική έχει επίσης περιορισμούς καθώς οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για ενίσχυση θα εισάγουν μια μεροληψία καθώς συνδέονται σε περιοχές που δεν είναι 100% διατηρημένες σε όλα τα βακτήρια και, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα βακτήρια μπορούν να αναγνωριστούν μόνο σε επίπεδο γένους λόγω της υψηλής ομοιότητας μεταξύ του γονιδίου 16S rRNA από στενά συγγενικά είδη. Επιπλέον αυτή η μέθοδος δεν παρέχει πληροφορίες για την αντιμικροβιακή ευαισθησία (Gurta et al., 2019).

Τα μυκητιακά παθογόνα ταυτοποιούνται επίσης χρησιμοποιώντας την αλληλουχία rRNA, αν και είναι λιγότερο καθιερωμένη πρακτική από ό,τι για βακτηριακούς στόχους. Οι πιο κοινές περιοχές για αναγνώριση μυκήτων είναι οι περιοχές ITS 1 και 2, καθώς και οι υπερμεταβλητές περιοχές D1 και D2 του συστατικού μεγάλης υπομονάδας 28S rRNA. Η συστοιχία rDNA περιέχει τον εσωτερικό μεταγραφόμενο διαχωριστή (ITS), ο οποίος βρίσκεται μεταξύ των κωδικοποιητικών τμημάτων των rDNA SSU και LSU. Κατηγοριοποιείται σε ITS1 και ITS2, με το γονίδιο 5.8S rDNA να τα διαχωρίζει. Αν και παλαιότερα πιστευόταν ότι το ITS δεν είχε σκοπό, οι Lalev και Nazar πρότειναν ότι το ITS1 μπορεί να έχει αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της βιογένεσης των ριβοσωμάτων ή να χρησιμεύσει ως υποστηρικτικός παράγοντας στη διαδικασία. Επιπλέον, διατηρημένες περιοχές

εσωτερικών μεταγραμμένων διαχωριστών έχουν ανακαλυφθεί σε μια ποικιλία ευκαρυωτών, υποδηλώνοντας μια συμμετοχή του ITS2 στην προ-rDNA ωρίμανση (Froeschke & von der Heyden, 2014).

Ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων ITS ανά κύτταρο (έως 250) καθιστά την περιοχή ελκυστικό στόχο για την αλληλούχιση περιβαλλοντικών υποστρωμάτων όπου η ποσότητα του DNA που υπάρχει είναι χαμηλή. Ολόκληρη η περιοχή ITS έχει συνήθως στοχευθεί με παραδοσιακές προσεγγίσεις αλληλουχίας Sanger και τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 450 και 700 bp. Περισσότερες από 100.000 αλληλουχίες ITS προερχόμενες από μύκητες έχουν αλληλουχηθεί με τη συμβατική μέθοδο Sanger. Ωστόσο, αυτά τα δεδομένα παρεμποδίζονται σε κάποιο βαθμό από εσφαλμένες ταυτοποιήσεις ή τεχνικά σφάλματα, όπως η ανάμειξη προτύπων DNA ή σφάλματα αλληλουχίας. Είτε η περιοχή ITS1 είτε η περιοχή ITS2 έχουν στοχευθεί σε πρόσφατες μελέτες αλληλούχισης υψηλής απόδοσης, επειδή ολόκληρη η περιοχή ITS είναι ακόμα πολύ μεγάλη για την αλληλούχιση 454 ή άλλες μεθόδους προσδιορισμού υψηλής απόδοσης. Χρησιμοποιώντας NGS, χιλιάδες αλληλουχίες μπορούν να αναλυθούν από ένα μόνο περιβαλλοντικό δείγμα, επιτρέποντας σε βάθος ανάλυση της ποικιλίας των μυκήτων. Διάφοροι εκκινητές χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση ολόκληρης ή τμημάτων της περιοχής ITS (Bellemain et al., 2010).

Εκτός από την προαναφερθείσα μέθοδο οι μύκητες μπορούν να αναγνωριστούν χρησιμοποιώντας το γονίδιο 18S rDNA. Η αλληλουχία του γονιδίου 18S rRNA σπάνια αναλύει τα ταξινομικά είδη των μυκήτων σε επίπεδο είδους ή γένους, αλλά είναι ένας σημαντικός φυλογενετικός δείκτης για μια αξιόπιστη ταξινόμηση μη περιγραφόμενων μυκητιακών ταξινομήσεων. Επιπλέον, αντιπροσωπεύεται από τον υψηλότερο αριθμό ακολουθίας σε δημόσιες βάσεις δεδομένων που καλύπτει όλες τις κύριες ομάδες μυκήτων σε σύγκριση με την αλληλουχία γονιδίου 28S rRNA (Yarza et al., 2017).

Η NGS μεταμόρφωσε τη γονιδιωματική επιτρέποντας την ταχεία και ολοκληρωμένη ανάλυση των γενετικών διαταραχών, της γονιδιωματικής του καρκίνου και της εξατομικευμένης ιατρικής. Η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) και η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος (WES) έγιναν πολύτιμα εργαλεία στη διάγνωση και στον σχεδιασμό θεραπείας. Το NGS διευκόλυνε επίσης πολλές ανακαλύψεις σε τομείς όπως η εξελικτική βιολογία, η μικροβιολογία

και η περιβαλλοντική επιστήμη, επιτρέποντας έργα μεγάλης κλίμακας όπως το Έργο Ανθρώπινου Γονιδιώματος και το Έργο Μικροβιώματος της Γης.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στο NGS περιλαμβάνουν σημαντικές μειώσεις κόστους, καθιστώντας την αλληλούχηση πιο προσιτή σε ένα ευρύτερο φάσμα ερευνητών και κλινικών γιατρών. Η επίτευξη του ορόσημου του γονιδιώματος των 1.000 \$ επιτάχυνε περαιτέρω την υιοθέτηση των τεχνολογιών NGS. Η ενσωμάτωση των δεδομένων NGS με άλλα ωμικά δεδομένα, όπως η μεταγραφική και η πρωτεομική, έχει προσφέρει μια πιο ολοκληρωμένη κατανόηση των βιολογικών συστημάτων. Η πρόοδος στις τεχνολογίες αλληλούχησης μονοκυττάρου επέτρεψε την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου, παρέχοντας πληροφορίες για την κυτταρική ετερογένεια και τις πολύπλοκες βιολογικές διεργασίες. Καθώς το NGS συνεχίζει να εξελίσσεται, οι συνεχείς βελτιώσεις στην ακρίβεια, την ταχύτητα και την αποδοτικότητα κόστους οδηγούν νέες ανακαλύψεις και εφαρμογές σε ένα ευρύ φάσμα επιστημονικών κλάδων.

Η μέθοδος προσδιορισμού αλληλουχίας γνωστή ως αλληλούχηση όλων των εξωνίων (WES, Whole Exome Sequencing) επικεντρώνεται στον εντοπισμό και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του εξωνίων ή των τμημάτων του γονιδιώματος που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες. Ενώ αποτελούν μόλις το 1%-2% του συνολικού γονιδιώματος, η πλειονότητα των παραλλαγών που είναι γνωστό ότι προκαλούν ασθένεια βρίσκονται στο εξώμα. Το WES καθιστά δυνατό τον εντοπισμό γενετικών διαφορών μέσα στα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως εισαγωγές, διαγραφές και παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs), με αλληλούχηση του εξώματος. Για ασυνήθιστες κλινικές διαταραχές με ομάδες συμπτωμάτων, καθώς και για την ανακάλυψη παραλλαγών για τον πληθυσμό και τη γονιδιωματική του καρκίνου, το WES είναι μια πιο προσιτή επιλογή για το WGS. Οι μέθοδοι ενίσχυσης ή υβριδικής σύλληψης με συγκεκριμένο στόχο χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό εξωνικών περιοχών στο WES και υψηλής απόδοσης (Belkadi et al., 2015).

Η μεταγονιδιωματική αλληλούχηση, η οποία συνεπάγεται μη στοχευμένη αλληλουχία του DNA ενός δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση όλων των μικροοργανισμών —δηλαδή, όχι μόνο των βακτηρίων που υπάρχουν— στο επίπεδο του είδους ή ακόμη και του στελέχους και παρέχει λεπτομέρειες σχετικά με τις δυνατότητες της κοινότητας για λειτουργία με βάση τη σύγκριση με βάσεις

δεδομένων. Η μετρατρανσκριπτική (RNASeq) περιλαμβάνει την αλληλούχιση ολόκληρου του mRNA σε ένα δείγμα (αφού έχει μετατραπεί σε cDNA) για να προσδιοριστεί η σχετική δραστηριότητα διαφόρων μελών της κοινότητας με βάση τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη βιοπληροφορική ανάλυση, την τεχνική αλληλούχισης και την προετοιμασία της βιβλιοθήκης είναι διαφορετικές σε αυτά τα τρία πειραματικά πρωτόκολλα. Τα πιο συχνά ληφθέντα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες είναι η  $\alpha$ - και η  $\beta$ -ποικιλομορφία καθώς και μια εκτίμηση της σχετικής αφθονίας ορισμένων ταξινομικών κατηγοριών (Yeluri Jonnala, et al., 2018).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup> ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΥΡΙΩΝ

Εκτός από τις κλασσικές εφαρμογές η NGS έχει φέρει επανάσταση σε διάφορες πτυχές της παραγωγής τυριού, ενισχύοντας σημαντικά την κατανόησή μας και τον έλεγχο των μικροβιακών κοινοτήτων που εμπλέκονται στη διαδικασία. Μία από τις κύριες εφαρμογές στην παραγωγή τυριού είναι η λεπτομερής ανάλυση των μικροβιακών κοινοτήτων. Αυτή η τεχνολογία επιτρέπει τον ακριβή χαρακτηρισμό και τη βελτιστοποίηση των καλλιεργειών εκκίνησης, οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για την έναρξη της διαδικασίας παρασκευής τυριού. Διασφαλίζοντας την παρουσία ευεργετικών μικροβιακών στελεχών, οι παραγωγοί μπορούν να επηρεάσουν τη γεύση, την υφή και τη συνολική ποιότητα του τυριού. Επιπλέον, κατά τα στάδια ωρίμανσης και ζύμωσης, το NGS παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη μικροβιακή δυναμική, επιτρέποντας καλύτερο έλεγχο και συνέπεια στην παραγωγή τυριού.

Ο ποιοτικός έλεγχος και η ασφάλεια είναι πρωταρχικής σημασίας στην παραγωγή τυριού και η NGS διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο σε αυτούς τους τομείς. Η τεχνολογία διευκολύνει την ταχεία και ακριβή ανίχνευση παθογόνων παραγόντων και οργανισμών που προκαλούν αλλοίωση, διασφαλίζοντας ότι το τυρί παραμένει ασφαλές για κατανάλωση. Επιπλέον, βοηθά στην ιχνηλασιμότητα, επιτρέποντας στους παραγωγούς να εντοπίζουν τις πηγές μικροβιακής μόλυνσης. Αυτή η ικανότητα είναι απαραίτητη για την έγκαιρη αντιμετώπιση των ζητημάτων μόλυνσης και την πρόληψη μελλοντικών περιστατικών, διατηρώντας έτσι υψηλά πρότυπα ασφάλειας των τροφίμων.

Η αναγνώριση στελεχών και ο έλεγχος ταυτότητας ενισχύονται επίσης από το NGS. Η τεχνολογία μπορεί να πιστοποιήσει την ταυτότητα διαφορετικών ποικιλιών τυριού διαμορφώνοντας το προφίλ των μοναδικών μικροβιακών κοινοτήτων τους, κάτι που βοηθά στην αποτροπή της απάτης και διασφαλίζει την ακεραιότητα του προϊόντος. Επιπλέον, η λεπτομερής γονιδιωματική ανάλυση επιτρέπει την επιλογή συγκεκριμένων στελεχών που επηρεάζουν θετικά τα χαρακτηριστικά του τυριού, ενισχύοντας τη συνολική ποιότητα του προϊόντος. Αυτή η ικανότητα είναι ιδιαίτερα πολύτιμη για τα βιοτεχνικά και παραδοσιακά τυριά, όπου η διατήρηση της αυθεντικότητας είναι ζωτικής σημασίας.

Η ανάπτυξη γεύσης και υφής στο τυρί είναι ένας άλλος σημαντικός τομέας στον οποίο εφαρμόζεται η NGS. Κατανοώντας τις μεταβολικές οδούς των μικροβίων που σχετίζονται με το τυρί, οι παραγωγοί μπορούν να χειριστούν αυτές τις οδούς για να επιτύχουν τις επιθυμητές αισθητηριακές ιδιότητες. Επιπλέον, η γενετική μηχανική μικροβιακών στελεχών που προσδιορίζονται μέσω της NGS μπορεί να ενισχύσει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στις μοναδικές γεύσεις και υφές διαφορετικών ποικιλιών τυριού. Αυτό το επίπεδο ελέγχου και προσαρμογής οδηγεί σε βελτιωμένη ποιότητα προϊόντων και καινοτομία στην παραγωγή τυριού.

Η περιβαλλοντική παρακολούθηση στις εγκαταστάσεις παραγωγής τυριού είναι μια άλλη εφαρμογή της NGS. Με την αλληλουχία των περιβαλλοντικών δειγμάτων, οι παραγωγοί μπορούν να παρακολουθούν την καθαριότητα των εγκαταστάσεων τους και να ανιχνεύουν πιθανές πηγές μόλυνσης. Αυτή η προληπτική προσέγγιση βοηθά στη διατήρηση ενός υγιεινού περιβάλλοντος παραγωγής, μειώνοντας τον κίνδυνο μόλυνσης και διασφαλίζοντας την ασφάλεια του τελικού προϊόντος.

Τέλος, η NGS υποστηρίζει την έρευνα και την ανάπτυξη στη βιομηχανία τυριού. Η τεχνολογία βοηθά στην ανάπτυξη νέων ποικιλιών τυριού παρέχοντας πληροφορίες για τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις και τις επιπτώσεις τους στις ιδιότητες του τυριού. Η δημιουργία γονιδιωματικών βιβλιοθηκών μικροβιακών στελεχών που σχετίζονται με την παραγωγή τυριού χρησιμεύει ως πολύτιμος πόρος για μελλοντικές προσπάθειες έρευνας και ανάπτυξης. Αυτή η ολοκληρωμένη κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων και των λειτουργιών τους ενισχύει την καινοτομία και βοηθά τους παραγωγούς να δημιουργήσουν νέα και βελτιωμένα τυροκομικά προϊόντα.

Ακολούθως θα αναλυθούν οι βασικές εφαρμογές της NGS παραθέτοντας συγκεκριμένες μελέτες.

#### **4.1. Μελέτη της μικροβιακής κοινότητας**

Πριν αναφερθούν πληροφορίες για τις τεχνικές ανάλυσης της μικροβιακής κοινότητας των τυριών θα αναφερθούν οι βασικές κατηγορίες μικροβίων που απαντώνται. Τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης στην παρασκευή τυριού, γεγονός που βοηθά στη διατήρηση του προϊόντος και του

προσδίδει οργανοληπτική ποιότητα. Αυτά τα στελέχη εισάγονται με διαφορετικό τρόπο, που αναπτύσσονται σε μέσα όπως το γάλα. Επιπλέον, ο ορός γάλακτος που έχει επωαστεί την προηγούμενη ημέρα χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια έναρξης στη Γαλλία και την Ιταλία. Ο όρος "εκκινητές" αναφέρεται στα βακτήρια που ξεκινούν τη σύνθεση του γαλακτικού οξέος. Αυτά τα βακτήρια είναι θεرمόφιλα και μεσόφιλα. Οι λευκονόκοκοι (*Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* και *Leuconostoc lactis*) και οι γαλακτόκοκοι (*Lactococcus lactis subsp. lactis* και *Lactococcus lactis subsp. cremoris*) είναι παραδείγματα μεσόφιλων βακτηρίων. Οι *Streptococcus thermophilus* και αρκετά είδη *Lactobacillus*, όπως το *Lb. delbrueckii* και *Lb. helveticus*, είναι παραδείγματα θεرمόφιλων καλλιεργειών (Altieri et al., 2017). Σε άλλα τυριά ως καλλιέργεια εκκίνησης προστίθενται και τα βακτήρια του γένους *Propionibacterium* (Emmental, Gruyère), *Brevibacterium* και *Corynebacterium* (τυριά που έχουν ωριμάσει για επάλειψη) .

Η επιφάνεια του τυριού χαρακτηρίζεται από αερόβια βακτήρια, συγκεκριμένα *Brevibacterium spp.*, *Bacillus spp.* και *Micrococcus spp.* Επίσης, στην επιφάνεια έχουν ανιχνευθεί και Gram-αρνητικά βακτήρια και βακτήρια ανθεκτικά στα άλατα που ανήκουν σε διαφορετικό γένος, συμπεριλαμβανομένων των *Halomonas*, *Vibrio* και *Hafnia spp.*, Τα κυρίαρχα μικρόβια μέσα στο τυρί είναι αναερόβιοι ή προαιρετικοί αερόβιοι μικροοργανισμοί (Monnet, et al., 2015).

Εκτός από τα βακτήρια γαλακτικού οξέος οι ζύμες *Debaryomyces hansenii* και *Yarrowia lipolytica* είναι πολλά υποσχόμενες καλλιέργειες εκκίνησης τυριού που επηρεάζουν και την ωρίμανση του τυριού. Ένα παράδειγμα ζύμης ως δευτερεύουσας καλλιέργειας εκκίνησης είναι το *Penicillium roqueforti* και το *Penicillium camemberti* που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μπλε τυριών καθώς ανέχονται τις συνθήκες υψηλής και μέσης αλατότητας και διαθέτουν υψηλή πρωτεολυτική δράση. Στην επιφάνεια της πλειονότητας των τυριών, νηματοειδείς μύκητες όπως το *Fusarium domesticum*, το *Scopulariopsis (Sc.) flava* και το *Sc. casei* μπορούν επίσης να ανιχνευθεί σε μικρές ποσότητες. Όλα αυτά τα πρόσθετα είδη μούχλας -εκτός από το *P. roqueforti*- έχουν βρεθεί μόνο στο τυρί, γεγονός που δείχνει ότι έχουν «εξημερωθεί» σε αυτό το συγκεκριμένο περιβάλλον. Το *P. camemberti*, για παράδειγμα, προσαρμόστηκε γρήγορα από τον άγριο πρόγονό του *Penicillium commune*, με αποτέλεσμα μειωμένη παραγωγή μυκοτοξινών, μειωμένη μελάγχρωση



και - το πιο σημαντικό - μια μετατόπιση του προφίλ των πτητικών συστατικών από γήινο σε τυρένιο (Bodinaku et al., 2019).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ευπαθή τρόφιμα που παρέχουν ένα καλό μέσο για την ανάπτυξη μικροβίων. Τα τροφιμογενή παθογόνα όπως ο *Staphylococcus aureus* στο νωπό γάλα μπορεί να προέρχονται από μολυσμένα θηλάζοντα ζώα, από ανεπιθύμητες συνθήκες αρμέγματος που οδηγούν σε μόλυνση του γάλακτος με περιπτώματα ζώων και άλλα υλικά. Ο λανθασμένος χειρισμός του εξοπλισμού, ο ανεπαρκής καθαρισμός και απολύμανση μπορεί να οδηγήσουν και σε μόλυνση του τυριού.

Πολλά χειροποίητα τυριά, ειδικά αυτά που παρασκευάζονται στη νότια Ευρώπη, έχουν σημαντικές συγκεντρώσεις βακτηρίων εντερόκοκκου, τα οποία έχουν αντίκτυπο στο άρωμα, το χρώμα και τη δομή (Carlos et al., 2009). Με την πιθανή εξαίρεση των προβιοτικών μικροοργανισμών, που μπορεί να προέρχονται από το γάλα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριού, δεν προστίθενται σκόπιμα στο γάλα για τυροκομία. Δεδομένου ότι πολλοί εντερόκοκκοι είναι ανθεκτικοί στην παστερίωση, μπορούν να βρεθούν σε τυριά που παρασκευάζονται τόσο από ωμό όσο και από παστεριωμένο γάλα. Τα τυριά με νωπό γάλα συχνά φιλοξενούν εντερόκοκκους. Βέβαια, έχουν συνδεθεί με μια σειρά από νοσοκομειακές ασθένειες τα τελευταία χρόνια καθώς φέρουν γονίδια με αντίσταση στα αντιβιοτικά (Franz et al., 2011).

Τέλος, σε αρκετές περιπτώσεις θεωρούνται επικίνδυνα και τα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια. Οι κύριοι σχηματιστές σπορίων στο γάλα είναι τα είδη του γένους *Clostridium*, *Bacillus* και *Geobacillus*. Αυτά τα βακτήρια είναι τα εξής: *C. sporogenes*, *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *B. cereus*, *B. sporothermodurans*, *G. stearothermophilus*. Για την εμφάνιση ελαττωμάτων στο τυρί ως αρωματικά, το όψιμο φύσημα είναι υπεύθυνο το *C. Tyrobutyricum* (György & Laslo, 2021).

Τα τελευταία χρόνια, έχουν καταβληθεί μεγάλες προσπάθειες για την εκμετάλλευση των ανταγωνιστικών δράσεων των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται καλλιέργειες LAB για την πρόληψη και τον έλεγχο του *L. monocytogenes* και άλλων μικροοργανισμών που αλλοιώνουν το τυρί συμπεριλαμβανομένου του *Clostridium tyrobutyricum*. Οι προστατευτικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται επειδή παράγουν ανταγωνιστικούς μεταβολίτες

όπως βακτηριοσίνες, πεπτίδια και/ή χαμηλού βάρους μη πρωτεϊνικές ενώσεις (οργανικά οξέα, λιπαρά οξέα, υπεροξειδιο του υδρογόνου) και διαφέρουν από τις καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται κυρίως για τις τεχνολογικές τους λειτουργίες (παραγωγή οξέων και αρωματικών ενώσεων) (Irlinger & Mounier, 2009).

Η μικροχλωρίδα των τυριών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η πηγή και η ποιότητα του γάλακτος, η διαδικασία παρασκευής του τυριού και οι περιβαλλοντικές συνθήκες. Το είδος του γάλακτος (αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο) και η επεξεργασία του (ωμό έναντι παστεριωμένου) επηρεάζουν σημαντικά τη μικροβιακή ποικιλότητα, όπως και η διατροφή και το περιβάλλον των γαλακτοπαραγωγών ζώων. Κατά τη διάρκεια της παραγωγής τυριού, τα συγκεκριμένα στελέχη που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης είναι κρίσιμα για τη διαμόρφωση της μικροχλωρίδας, μαζί με τους μη εκκινητικούς μικροοργανισμούς που υπάρχουν φυσικά στο γάλα ή που εισάγονται από το περιβάλλον. Η μέθοδος πήξης, είτε με πυτιά είτε με οξύ, και η επακόλουθη επεξεργασία του τυροπήγματος, όπως το κόψιμο, το μαγείρεμα και το πλύσιμο, παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο. Επιπλέον, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία και οι συνθήκες παλαίωσης στις εγκαταστάσεις ωρίμανσης του τυριού συμβάλλουν στο τελικό μικροβιακό προφίλ, επηρεάζοντας τελικά τη γεύση, την υφή και την ασφάλεια του τυριού (Yeluri Jonnala et al., 2018).

Μεταξύ των παραγόντων που επηρεάζουν τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας είναι και η άλμη. Η μικροβιακή ποικιλομορφία και η σύνθεση της άλμης ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του τυριού που παρασκευάζεται, το συγκεκριμένο φυτό τυριού και τις συγκεντρώσεις αλατότητας. Τα τυχαία βακτήρια που υπάρχουν στην άλμη, όπως ο *Staphylococcus equorum*, μπορούν να έχουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση κατά του *L. monocytogenes* στις επιφάνειες του τυριού και μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ιδιοτήτων γεύσης και χρώματος των τυριών που έχουν ωριμάσει με επάλειψη. Ωστόσο, η μολυσμένη άλμη μπορεί με τη σειρά της να μολύνει τον πυρήνα και την επιφάνεια του τυριού, με το τυρί Mozzarella να είναι ένα από τα τυριά που είναι ευαίσθητα σε τέτοια αλλοίωση (Marino et al., 2017).

Στο παρελθόν, η διερεύνηση της μικροβιακής ανάπτυξης γινόταν κυρίως με τη χρήση τυπικών μικροβιολογικών μεθόδων. Το χρυσό πρότυπο για τον μικροβιακό χαρακτηρισμό είναι η καλλιέργεια, η οποία αποδίδει τεράστιες ποσότητες κυττάρων

από έναν κλωνικό πληθυσμό και επιτρέπει την εκτέλεση αρκετών λειτουργικών δοκιμών στη βιοχημεία, τη φυσιολογία και τη γενετική των βακτηρίων. Η εξαρτώμενη από την καλλιέργεια προσέγγιση βασίζεται στα αναπτυσσόμενα βακτήρια και συνεπάγεται τα ακόλουθα βήματα: ανάπτυξη βακτηρίων σε μικροβιακά μέσα πριν από την απαρίθμηση, απομόνωση, ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους και χαρακτηρισμός του βιοτύπου σε ενδοειδικό επίπεδο. Μέσω της χρήσης τεχνικών καλλιέργειας και πιθανών χρήσεων μικροβίων στο τυρί ως καλλιέργειες εκκίνησης, μπορεί να εκτιμηθεί ο αριθμός των μονάδων σχηματισμού αποικιών (CFU, Colony Forming Units) σε διαφορετικές μικροβιακές ομάδες καθώς και η απομόνωση μικροοργανισμών. Το είδος-στόχος μπορεί να είναι σπάνιο ή απλώς μη καλλιεργήσιμο, καθιστώντας τις χρονοβόρες προσεγγίσεις που εξαρτώνται από την καλλιέργεια ανακριβείς. Περιλαμβάνουν επίσης ένα στάδιο καλλιέργεια και δεν μπορούν επομένως να χρησιμοποιηθούν ως ειδικό εργαλείο παρακολούθησης της κοινότητας.

Αν και ο ίδιος ο Koch αναγνώρισε ότι διαφορετικά βακτήρια ευδοκίμουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα, η πλειονότητα των βακτηρίων βρέθηκε ότι ήταν μη καλλιεργήσιμα χρησιμοποιώντας συμβατικές μεθόδους στις αρχές του 1900, ένα φαινόμενο που έγινε γνωστό ως «η ανωμαλία του αριθμού των μεγάλων πλακών». Κατά συνέπεια, ένα πολύ περιορισμένο κλάσμα εύκολα καλλιεργήσιμων, ιατρικά ή κτηνιατρικά σημαντικών βακτηρίων που ευδοκίμουν παρουσία μεγάλων φορτίων θρεπτικών συστατικών αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος όσων είναι τώρα κατανοητό για τη βακτηριακή φυσιολογία (Lagier et al., 2015).

Τα προβλήματα με τη χρήση της καλλιέργειας για την ανάλυση της μικροβιακής κοινότητας προκύπτουν από το γεγονός ότι ένα τεχνητό ομοιογενές μέσο επιτρέπει συνήθως την ανάπτυξη μόνο ενός μικρού κλάσματος των οργανισμών. Επιπλέον, όταν σύνθετες μικροβιακές κοινότητες βρίσκονται υπό διερεύνηση, η απαρίθμηση βακτηρίων με παραδοσιακές τεχνικές μικροβιακής καλλιέργειας μπορεί να παράγει λανθασμένα αποτελέσματα. Επιπλέον, η καλλιέργεια αποτυγχάνει να αναπαράγει τις οικολογικές θέσεις και τις συμβιωτικές σχέσεις που συναντώνται σε πολύπλοκα φυσικά περιβάλλοντα που απαιτούνται για την υποστήριξη του πλήρους φάσματος της μικροβιακής ποικιλότητας. Εκτός από την επιλεκτική δυνατότητα ανάπτυξης ορισμένων ειδών και την καταστολή της ανάπτυξης άλλων, η σύνθεση της κοινότητας

του καλλιεργήσιμου κλάσματος παραμορφώνεται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας επειδή οι χρόνοι αναπαραγωγής ποικίλλουν, με τα ταχέως αναπτυσσόμενα είδη να ανταγωνίζονται αποτελεσματικά άλλα. Τέλος, κατά την ωρίμανση του τυριού, τα στελέχη μπορεί να εισέλθουν σε βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση. Κατά συνέπεια, το περιβάλλον του τυριού μπορεί να κατοικηθεί με μια ποικιλία τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων ανέπαφων, βιώσιμων, μη βιώσιμων και μερικώς ή πλήρως αυτολυμένων κυττάρων τα οποία ωστόσο δεν ανιχνεύονται (Carraro et al., 2011).

Πλέον οι μελέτες επικεντρώνονται στη μελέτη της μικροβιακής κοινότητας με τεχνολογίες NGS. Μια μελέτη 60 ιρλανδικών μαλακών, σκληρών και ημίσκληρων τυριών με χρήση ενισχυτών γονιδίου 16S rRNA ήταν η πρώτη μεγάλης κλίμακας, ενδεδειγμένη εξέταση της μικροχλωρίδας του τυριού χρησιμοποιώντας τεχνικές που δεν βασίζονται στην καλλιέργεια. Βρέθηκε ότι το *Prevotella* και το *Arthrobacter* είναι δύο από τα νέα βακτηριακά είδη που βρίσκονται στο τυρί, και ανακαλύφθηκε επίσης ότι το είδος του τυριού, ο τόπος παραγωγής του γάλακτος, οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή και τα πρόσθετα επηρέασαν τη σύνθεση του βακτηριακού πληθυσμού (Afshari et al., 2018).

Σε μια μελέτη των Sattin et al., η NGS χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων ορού γάλακτος που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή Ricotta, με στόχο να χαρακτηρίσει τη σύνθεση της μικροβιακής κοινότητας τους χρησιμοποιώντας τόσο RNA όσο και DNA ως πρότυπα για την κατασκευή βιβλιοθήκης. Η μελέτη αποκάλυψε ότι τα δείγματα ορού γάλακτος με υψηλά μικροβιακά και αερόβια φορτία σπορίων περιείχαν κυρίως *Firmicutes*, αν και παρατηρήθηκε μεταβλητότητα με ορισμένα δείγματα που περιείχαν αξιοσημείωτες ποσότητες *Gamma*proteobacteria. Είναι ενδιαφέρον ότι οι παρτίδες ορού γάλακτος που αποκτήθηκαν για την παραγωγή Ricotta, οι οποίες εμφάνιζαν ελαττωματικές οργανοληπτικές ιδιότητες, υποβλήθηκαν σε περαιτέρω έρευνα. Διεξήχθη μια ανάλυση αερίου χρωματογραφίας/φασματομετρίας μάζας (GC/MS) για τον καθορισμό πτητικών ενώσεων σε κανονικά έναντι ελαττωματικών δειγμάτων ορού γάλακτος. Η στατιστική ανάλυση έδειξε διακριτές μικροβιακές κοινότητες μεταξύ της αλληλουχίας της βιβλιοθήκης DNA και cDNA, τονίζοντας ότι η σύνθεση μικροχλωρίδας σε δείγματα

ορού γάλακτος με ελαττωματικά οργανοληπτικά διέφερε σημαντικά από τα κανονικά (Sattin et al., 2016).

Πολύ λίγες έρευνες έχουν εξετάσει τις ιδιότητες του τυριού Sfela, ιδιαίτερα τη μικροβιολογία του, παρά την ονομασία του ως ΠΟΠ. Από τους Tsouggou et al., εξετάστηκε η μικροχλωρίδα δύο δειγμάτων βιομηχανικού τυριού Sfela που ήταν ΠΟΠ και δύο παραλλαγές μη ΠΟΠ, Sfela τουλουμοτήρι και Ξεροσφέλι. Η μικροχλωρίδα αυτών των παραδοσιακών τυριών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας μεταγονιδιωματική ανάλυση shotgun, αλληλουχία αμπλικονίου 16S rDNA και φασματομετρία μάζας εκρόφησης/ιοντισμού λέιζερ υποβοηθούμενη από μήτρα (MALDI-TOF MS). Σύμφωνα με έρευνα που βασίζεται σε καλλιέργεια, τα είδη *Enterococcus faecium*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus* και *Streptococcus thermophilus* ήταν τα πιο συχνά απομονωμένα είδη από το τυρί Sfela. Σύμφωνα με τη μελέτη shotgun, ο *Lactococcus lactis* υπήρχε σε μεγάλες ποσότητες στη βιομηχανική Sfela όπως και το στέλεχος *Str. Thermophilus*. Το μόνο είδος ζύμης που υπήρχε αποκλειστικά στο δείγμα Sfela τουλουμοτήρι και είχε αφθονία μεγαλύτερη από 1% ήταν το *Debaryomyces hansenii*. Ήταν δύσκολο να εντοπιστούν άλλα είδη ζύμης με την αλληλούχηση νέας γενιάς, ίσως λόγω της χαμηλής αφθονίας τους (Tsouggou et al., 2024).

Οι Da Silva Abreu et al., θέλησαν να χαρακτηρίσουν τη βακτηριακή ποικιλομορφία της βιολογικής και συμβατικής παραγωγής τυριού Minas Frescal, μέσω της ανάλυσης NGS του γονιδίου 16S rRNA. Το DNA εξήχθη από 96 δείγματα, 48 από βιολογική παραγωγή και 48 από συμβατική παραγωγή. Ταυτοποιήθηκαν οι βακτηριακές οικογένειες και τα γένη με τον υψηλότερο επιπολασμό. Τα αποτελέσματα της μελέτης τους έδειξαν ότι οι πιο διαδεδομένες οικογένειες ήταν τα *Enterobacteriaceae*, *Planococcaceae* και *Moraxellaceae* (Abreu et al., 2021).

Γενικά, ο εντοπισμός των βακτηριακών ειδών στο τυρί και ειδικά σε αυτά τύπου ΠΟΠ είναι σημαντική καθώς συμβάλλουν σημαντικά στις τελικές οργανοληπτικές ιδιότητες, στη διαδικασία ωρίμανσης, στη διάρκεια ζωής, στην ασφάλεια και στη συνολική ποιότητα του τυριού. Η μελέτη των Papadakis et al είχε ως στόχο τον εντοπισμό βακτηριακών ειδών σε δέκα εμπορικά τυριά φέτα ΠΟΠ από την Ήπειρο και τη Θεσσαλία στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας μεταγονιδιωματική ανάλυση 16S rRNA. Η ανάλυση αποκάλυψε μια ποικιλόμορφη μικροχλωρίδα στα δείγματα,

αποτελούμενη από πέντε φυλές, 17 οικογένειες, 38 γένη και 59 βακτηριακά είδη. Το κυρίαρχο γένος ήταν τα *Firmicutes*, ακολουθούμενα από τα *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* και *Tenericutes*. Σημειωτέον, οι οικογένειες *Streptococcaceae* και *Lactobacillaceae* ήταν οι πιο άφθονες, περιλαμβάνοντας κυρίως βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) από καλλιέργειες εκκίνησης. Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκαν 21 μη εκκινητικά βακτήρια γαλακτικού οξέος (NSLAB). Η μικροχλωρίδα κάθε γεωγραφικής περιοχής είχε διακριτικά χαρακτηριστικά, αν και η χρήση καλλιεργειών εκκίνησης δημιούργησε ένα επικαλυπτόμενο μικροβιακό προφίλ. Είναι ενδιαφέρον ότι η σπάνια βιόσφαιρα του τυριού φέτα περιελάμβανε *Zobellella taiwanensis* και *Vibrio diazotrophicus*, δύο αρνητικά κατά Gram βακτήρια που δεν είχαν αναφερθεί προηγουμένως στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Papadakis et al., 2022).

#### **4.2. Μελέτη της αυθεντικότητας των τυριών**

Ο όρος «αυθεντικότητα» για τα τρόφιμα συνδέεται με το γεγονός ότι υπάρχει «ταίριασμα μεταξύ των χαρακτηριστικών του προϊόντος τροφίμων και των αντίστοιχων ισχυρισμών του προϊόντος διατροφής». Τα γαλακτοκομικά προϊόντα έχουν αναγνωριστεί σταθερά ως μια από τις πιο κοινές απάτες τροφίμων τα τελευταία χρόνια, με το τυρί να είναι το πιο κοινό τρόφιμο που νοθεύεται. Τα πιο συνηθισμένα περιστατικά σε αυτήν την περίπτωση ήταν νοθεία/υποκατάσταση και παραποιημένη γραφειοκρατία. Από το 2000 έως το 2018, 245 παραδείγματα απάτης στα γαλακτοκομικά αναφέρθηκαν στο πρόγραμμα HorizonScan, μια υπηρεσία που βασίζεται σε συνδρομές που παρακολουθεί παγκόσμια ανησυχίες για την ακεραιότητα των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της αναγνώρισης της επωνυμίας (Gimonkar et al., 2021).

Υπάρχουν δύο μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επαλήθευση της προέλευσης του τυριού. Υποθέτοντας ότι οι ποσότητες των βιολογικών ή/και χημικών συστατικών παραμένουν σταθερές για ένα δεδομένο τυρί σε ένα δεδομένο σημείο της παρασκευής ή της διάρκειας ζωής του, η πρώτη συνεπάγεται την εξέταση της σύνδεσης μεταξύ των συστατικών του. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό, φαίνεται ότι οι τεχνικές αναγνώρισης προτύπων παράγουν διακριτές κατηγορίες που μπορούν να

χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση μεταξύ αυθεντικών και πλαστών προϊόντων . Η δεύτερη προσέγγιση αναζητά ορισμένα χημικά ή βιολογικά συστατικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για συμβατικές μεθόδους ελέγχου ταυτότητας τυριού (όπως ανάλυση φασματομετρίας μάζας, σταθερή αναλογία ισοτόπων και ιχνοστοιχεία), τα οποία μπορούν να αντιπροσωπεύουν τη χημική σύνθεση του τυριού (Danezi et al., 2019).

Επειδή τα παραδοσιακά και βιοτεχνικά τυριά παράγονται με μια πιο διαφοροποιημένη μικροχλωρίδα που σχετίζεται με τη διαδικασία τυροκομίας (π.χ. χρήση νωπού γάλακτος, ορεκτικού, άλμης, εξοπλισμού και υλικών και αίθουσες ωρίμανσης), η λήψη δακτυλικών αποτυπωμάτων μικροβίων παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον για τη γεωγραφική προέλευση. Η αναγνώριση της προέλευσης του τυριού μπορεί να βασίζεται σε διακριτές παραλλαγές στη σύνθεση αυτής της πολύπλοκης μικροχλωρίδας, η οποία αποτελείται από ιούς, μύκητες, βακτήρια και αρχαία (Cardin et al., 2022).

Οι Ribani et al., χρησιμοποίησαν την αλληλούχιση Ion Torrent για την αναγνώριση ειδών χρησιμοποιώντας τρεις περιοχές ενισχυμένου μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) στο DNA γαλακτοκομικών προϊόντων. Η τεχνική δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας αναγνώσεις αλληλουχίας από τρεις βιβλιοθήκες που ήταν είτε ομαδοποιημένα αμπλικόνια είτε τεχνητές δεξαμενές DNA. Στη συνέχεια, όλα τα αναμενόμενα είδη καθώς και αρκετά μη χαρακτηρισμένα είδη συγκρίθηκαν σε αυτά που υπάρχουν στις βιβλιοθήκες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μικτά δείγματα αιγοπρόβειου γάλακτος, ένα τυρί μοτσαρέλα βουβάλου, ένα κατσικίσιο τυρί Crescenza και ένα χειροποίητο τυρί Ricotta. Μέσω της εξόρυξης παραγόμενων αναγνώσεων, εντοπίστηκαν διακριτοί τύποι γαλακτοκομικών ειδών, μαζί με την παρουσία ανθρώπινου DNA που μπορεί να χρησιμεύσει ως πιθανός δείκτης για την παρακολούθηση του υγειονομικού προτύπου των γαλακτοκομικών προϊόντων (Ribani et al., 2018).

Οι Paradimitriou et al., χρησιμοποίησαν τη μεταγονιδιωματική shotgun, την αλληλουχία αμπλικονίου εσωτερικού μεταγραφόμενου διαχωριστή (ITS) και το 16S rDNA για να εξετάσουν το μικροβίωμα εμπορικών και χειροποίητων δειγμάτων τυριού Φέτας από διάφορα μέρη της Ελλάδας. Το γένος *Lactococcus* αποδείχθηκε ότι είναι πιο κοινό στα χειροποίητα δείγματα σύμφωνα με τα δεδομένα 16S rDNA, αλλά τα γένη *Streptococcus* και *Lactobacillus* ήταν πιο κοινά στα δείγματα βιομηχανικού

ελέγχου. Τα αποτελέσματα υποστηρίχθηκαν από την ταυτοποίηση ειδών με τη χρήση μεταγονιδιωματικών *shotgun*, η οποία αποκάλυψε ότι ο *Lactococcus lactis* κυριαρχούσε σε δύο χειροποίητα δείγματα ενώ ο *Streptococcus thermophilus* και ο *Lactobacillus delbrueckii subsp.* Το *L. bulgaricus* κυριάρχησε σε ένα βιομηχανικό δείγμα. Τα αποτελέσματα του ITS έδειξαν ότι ο πληθυσμός ζυμομύκητα στα εξεταζόμενα δείγματα εμφάνιζε πλούσια ποικιλομορφία. Τα κύρια γένη που βρέθηκαν ήταν *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Cutaneotrichosporon*, *Pichia*, *Candida* και *Rhodotorula*. Η παρουσία πολλών τροφιογενών παθογόνων, όπως *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter cloacae* και *Streptococcus suis*, σε χειροποίητα δείγματα επιβεβαιώθηκε από τη συνολική ανάλυση της μεταγονιδιωματικής, αν και σε χαμηλή έως εξαιρετικά χαμηλή αφθονία (Papadimitriou et al., 2022).

Προκειμένου να εντοπιστούν πιθανοί γεωγραφικοί δείκτες, η βακτηριακή μικροχλωρίδα των δειγμάτων τυριού βοτάνων που ελήφθησαν από την επαρχία Σιρνάκ στη νοτιοανατολική Τουρκία αναλύθηκε χρησιμοποιώντας Illumina για την περιοχή του γονιδίου 16S rRNA V3–V4. Το κύριο γένος στη μικροχλωρίδα του τυριού που μελετήθηκε ήταν το *Firmicutes*, με τις πολυάριθμες οικογένειες *Lactobacillaceae* και *Streptococcaceae*. Σε 16 δείγματα βοτανικού τυριού, το *Companilactobacillus ginsenosidimutans* αποδείχθηκε ότι είναι το κυρίαρχο συστατικό των βακτηριακών κοινοπραξιών, καθιστώντας το πιο αξιοσημείωτο είδος. Το *Weissella jogaejeotgali* βρέθηκε σε 15 διαφορετικά δείγματα τυριού. Τέλος, το *Levilactobacillus koreensis* βρέθηκε σε τέσσερα δείγματα τυριού από βότανα. Βακτήρια γαλακτικού οξέος συμπεριλαμβανομένων των *Tetragenococcus halophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* και *Lactococcus raffinolactis* βρέθηκαν στα περισσότερα δείγματα όπως ήταν και αναμενόμενο (Rüstemoğlu et al., 2023).

### 4.3. Μελέτη της παραγωγικής διαδικασίας

Ένα από τα σημαντικότερα τμήματα της παραγωγικής διαδικασίας είναι η κατάσταση της πρώτης ύλης. Σε σύγκριση με το παστεριωμένο γάλα, το νωπό γάλα έχει περισσότερες πτητικές χημικές ουσίες, μια διαφοροποιημένη μικροβιακή κοινότητα και αμινοξέα και λιπαρά οξέα. Αυτά τα στοιχεία χάνονται κατά την



παστερίωση και εξαιτίας αυτής της διεργασίας, τα τυριά που παρασκευάζονται από νωπό γάλα έχουν καλύτερη και βαθύτερη γεύση (Fuka et al., 2013). Τα τυριά νωπού γάλακτος προσφέρουν ένα μοναδικό και πλούσιο μικροβίωμα σε σύγκριση με τα παστεριωμένα αντίστοιχα, επηρεάζοντας σημαντικά τη γεύση, την υφή και την ασφάλειά τους. Η ποικιλόμορφη μικροβιακή κοινότητα σε αυτά τα τυριά οφείλεται κυρίως στην παρουσία φυσικών βακτηρίων, ζυμών και μούχλας, τα οποία εξαλείφονται σε μεγάλο βαθμό κατά την παστερίωση. Αυτή η μικροβιακή ποικιλομορφία συμβάλλει στις πολύπλοκες γεύσεις και υφές που είναι χαρακτηριστικές των τυριών με νωπό γάλα.

Ωστόσο, το νωπό γάλα μπορεί επίσης να περιλαμβάνει ανεπιθύμητα βακτήρια, τα οποία μπορεί να αυξήσουν την πιθανότητα επιβίωσης παθογόνων στη μήτρα του «έτοιμου προς κατανάλωση» τυριού. Τα σημαντικότερα αυτών είναι βακτήρια του γένους *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* και *Campylobacter*. Αυτά τα παθογόνα μπορούν να εγκυμονούν κινδύνους για την υγεία, ειδικά εάν το τυρί δεν χειρίζεται και δεν παλαιώνει σωστά. Για το λόγο αυτό, το νωπό γάλα θεωρείται μικροβιολογικά επικίνδυνο και είναι σημαντικό να ελέγχεται η μικροβιακή του κοινότητα (Quigley et al., 2013).

Σε αυτό το πλαίσιο η μελέτη των Park et al., διερεύνησε τα φυσικοχημικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του τυριού Gouda που παρασκευάζεται από ωμό (R-GC) και παστεριωμένο γάλα (P-GC) κατά την παρασκευή και την ωρίμανση, εστιάζοντας στη δομή της βακτηριακής κοινότητας χρησιμοποιώντας NGS για το γονίδιο 16S rRNA. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, και τα δύο είδη τυριού εμφάνισαν ελαφρά αύξηση στην περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και λίπος και μείωση στην περιεκτικότητα σε υγρασία. Την έκτη εβδομάδα ωρίμανσης, το R-GC ήταν πιο μαλακό και ομαλό, με χαμηλότερη σκληρότητα, κολλώδη υφή και μασητικότητα σε σύγκριση με το P-GC. Η μεταγονιδιωματική ανάλυση αποκάλυψε ότι τα βακτηριακά γένη που χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες εκκίνησης, *Lactococcus* και *Leuconostoc*, ήταν κυρίαρχα και στα δύο τυριά. Επιπλέον, τα κολοβακτηρίδια όπως τα *Escherichia*, *Leclercia*, *Raoultella* και *Pseudomonas* ήταν αρχικά παρόντα στο R-GC αλλά όχι κατά την ωρίμανση (Park et al., 2019).

Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη στην περιοχή της Ανδαλουσίας χαρακτηρίστηκε η αυτοφυής χλωρίδα των LAB που συμμετέχουν στην παραδοσιακή ζύμωση

ημίσκληρων τυριών που παρασκευάζονται με ωμό πρόβειο γάλα της περιοχής. Λήφθηκαν τρία δείγματα τεσσάρων διαφορετικών τυριών του εμπορίου και πραγματοποιήθηκε μαζική αλληλούχιση για την αναγνώριση της χλωρίδας. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι κυρίαρχη γαλακτική χλωρίδα ήταν οι *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei* και *Lactococcus raffinolactis*, και σε μικρότερο βαθμό άλλα είδη του γένους *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* και *Leuconestoc*. Η συνοδευτική χλωρίδα αποτελούταν από είδη των γενών *Mycoplasma*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Mannheimia*, *Trueperella*, *Enterococcus*, *Vibrio*, *Serratia*, *Macrococcus*, *Staphylococcus*, *Massilia*, *Flavobacterium*, *Yersinia*, *Gallaecimonas*, *Hafnia*, *Leclercia*, *Obesumbacterium*, *Morganella* και *Kluyvera* (Ruiz, et al., 2019).

Ωστόσο, έχουν διεξαχθεί και μελέτες σε τυριά νωπού γάλακτος. Οι Dos Santos et al., στη μελέτη τους χρησιμοποίησαν την NGS για τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό των βακτηριακών κοινοτήτων στα παραδοσιακά τυριά νωπού γάλακτος. Η μελέτη ανέλυσε μια ομάδα πέντε δειγμάτων νωπού γάλακτος (ομάδα ελέγχου M1) από διαφορετικές γαλακτοκομικές φάρμες και εννέα ομάδες (M2-M10) 45 παραδοσιακών τυριών νωπού γάλακτος. Η ανάλυση αποκάλυψε 199 είδη κατανεμημένα σε 59 γένη στα δείγματα. Από αυτά τα γένη, 11 ήταν ευεργετικά για το άρωμα, τη γεύση, το χρώμα και την υφή του τυριού, ενώ 31 κρίθηκαν επιβλαβή για αυτά τα χαρακτηριστικά. Επιπλέον, 17 γένη ταυτοποιήθηκαν ως πιθανά παθογόνα για ζώα και ανθρώπους, συμπεριλαμβανομένων των *Aeromonas*, *Bacillus*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Staphylococcus* και κολοβακτηριδίων όπως *E. coli* και *Klebsiella*. Επίσης, βρέθηκε μια στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των βακτηριακών κοινοτήτων μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των δειγμάτων τυριού από νωπό γάλα (Santos et al., 2023).

Εκτός από τα τυριά νωπού γάλακτος η μικροχλωρίδα του γάλακτος καθορίζει και τα χαρακτηριστικά των άλλων τυριών. Η ιδιαιτερότητα του τυριού ΠΟΠ Comté συνδέεται με την ποικιλομορφία των φυσικών βακτηριακών κοινοτήτων νωπού γάλακτος, των οποίων οι πηγές ερευνήθηκαν από τους Chemidlin Prévost-Bouré et al.. Υποτέθηκε ότι αυτές οι μικροβιακές κοινότητες προέρχονται από μόνιμους βοσκοτόπους και μεταφέρονται μέσω της αλληλουχίας εδάφους-φυλλόσφαιρας-θηλής-γάλακτος από αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Αυτή η υπόθεση δοκιμάστηκε σε

44 γαλακτοκομικά αγροκτήματα στην περιοχή του τυριού ΠΟΠ Comté χαρακτηρίζοντας προκαρυωτικές και μυκητιακές κοινότητες σε αυτά τα διαμερίσματα χρησιμοποιώντας ανάλυση μεταγραφικού κώδικα (γονίδιο 16S rRNA: περιοχή V3–V4, γονίδιο 18S rRNA: περιοχή V7–V8). Η μελέτη βρήκε ισχυρούς και σημαντικούς συσχετισμούς μεταξύ των μικροβιακών κοινοτήτων των τεσσάρων διαμερισμάτων (έδαφος, φυλλόσφαιρα, θηλή και γάλα). Αυτοί οι δεσμοί επηρεάστηκαν από το pH του εδάφους, την ποικιλότητα των φυτών, την ανύψωση και τις γεωργικές πρακτικές, συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων οργανικής λίπανσης, της έντασης των βοοειδών και της φροντίδας της θηλής αγελάδας αποδεικνύοντας ότι αυτή η παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του γάλακτος και τη διαδικασία παραγωγής του τυριού (Chemidlin Prévost-Bouré et al., 2021).

Βασικό τμήμα της παραγωγικής διαδικασίας σε κάποιες ποικιλίες τυριών είναι η χρήση φυσικού ορού γάλακτος για την έναρξη της ζύμωσης. Είναι παραδοσιακά εμβόλια που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνική τυροκομία, ειδικά σε τυριά ΠΟΠ όπως η φέτα και το Parmigiano Reggiano, Provolone Valpadana, Mozzarella di Bufala Campana. Προερχόμενα από τον ορό γάλακτος προηγούμενων παρτίδων τυριού, αυτά τα ορεκτικά περιέχουν ένα ποικίλο μείγμα βακτηρίων γαλακτικού οξέος και άλλων ευεργετικών μικροβίων ζωτικής σημασίας για τη ζύμωση και την ωρίμανση. Παρέχουν μια πλούσια πηγή φυσικής μικροχλωρίδας, συμπεριλαμβανομένων τόσο των αρχικών όσο και των μη αρχικών βακτηρίων γαλακτικού οξέος (NSLAB), απαραίτητα για την ανάπτυξη της μοναδικής γεύσης και υφής του τυριού (Gatti et al., 2014).

Η μελέτη των Bertan et al., εξέτασε τη μικροχλωρίδα των φυσικών καλλιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριού Parmigiano Reggiano (PR) ΠΟΠ, εστιάζοντας στις αλλαγές με την πάροδο του χρόνου και ως απάντηση σε διαφορετικές τεχνολογικές πιέσεις. Δείγματα ορού γάλακτος από γαλακτοκομικό εργοστάσιο PR αναλύθηκαν σε διάστημα δέκα εβδομάδων από δύο γραμμές παραγωγής, τη συμβατική και τη βιολογική. Χρησιμοποιώντας qPCR και αλληλουχία υψηλής απόδοσης (HTS), η έρευνα αποκάλυψε ότι οι φυσικοί ορό γάλακτος (NWS) στην παραγωγή τυριού PR αποτελούν μια δυναμική μικροβιακή κοινότητα. Αυτά τα μικρόβια προσαρμόζονται σε διάφορες τεχνολογικές παραμέτρους κατά την

παρασκευή τυριού, διατηρώντας παράλληλα την ανθεκτικότητα των θερμοφίλων βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) που είναι ζωτικής σημασίας για την οξίνιση και την πρώιμη ωρίμανση του τυροπήγατος. Τα κύρια θερμοφιλά είδη του NWS παρουσιάζουν προσαρμοστικά χαρακτηριστικά που τους επιτρέπουν να διατηρήσουν τον τεχνολογικό τους ρόλο μέσω μιας οπισθοδρομικής διαδικασίας παραγωγής. Επίσης από τα αποτελέσματα της μελέτης τους φάνηκε ότι παρά τις αρχικές διαφορές, η βακτηριακή ποικιλομορφία μεταξύ του οργανικού και του συμβατικού NWS εξισορροπείται μετά το στάδιο μαγειρέματος, υποδεικνύοντας ότι οι τεχνολογικές επεξεργασίες διαμορφώνουν τη μικροχλωρίδα του NWS ανεξάρτητα από την αρχική σύνθεση (Bertani et al., 2020).

Μια αντίστοιχη μελέτη έγινε σε τυρί Mozzarella. Οι μικροβιακές κοινότητες από φυσικούς ορούς ορού γάλακτος μέχρι τελικά προϊόντα από τέσσερα διάσημα βιοτεχνικά γαλακτοκομικά εργοστάσια της Απουλίας διερευνήθηκαν μέσω της μεταγονιδιωματικής 16S. Οι χημικές ιδιότητες των δειγμάτων Mozzarella επίσης ανιχνεύθηκαν και αναλύθηκαν. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι ο γαλακτοβάκιλλος είναι το βασικό οξινιστικό συστατικό των χρησιμοποιούμενων καλλιεργειών εκκίνησης ορού γάλακτος, ενώ ορισμένα ψυχόφιλα ή μολυσματικά βακτήρια εμφανίζονται σε προϊόντα που σχετίζονται με τη θέση. Η βιοποικιλότητα βρέθηκε να είναι αρκετά παρόμοια μεταξύ των δεξαμενών δειγμάτων ορού γάλακτος και Mozzarella, ενώ ανιχνεύθηκε σημαντική διακύμανση μεταξύ των τοποθεσιών παραγωγής (εργοστάσια). Επιπλέον, η μικροβιακή ποικιλότητα του τυριού Mozzarella φάνηκε να συσχετίζεται θετικά με την περιεκτικότητά της σε γαλακτικό οξύ (Castellana et al., 2023).

Τα ελαττώματα του τυριού μπορεί να προκύψουν από διάφορους παράγοντες κατά την παραγωγή, την αποθήκευση και το χειρισμό. Ένα σημαντικό ελάττωμα είναι οι δυσάρεστες γεύσεις, οι οποίες μπορεί να προκληθούν από ακατάλληλη ζύμωση, μόλυνση ή χρήση κατώτερων συστατικών. Ένα άλλο κοινό πρόβλημα είναι η ανεπιθύμητη υφή, όπως η υπερβολική σκληρότητα, ο θρυμματισμός ή η ελαστικότητα, που συχνά προκύπτει από λανθασμένες συνθήκες γήρανσης ή μη ισορροπημένα επίπεδα υγρασίας. Οπτικά ελαττώματα, όπως ανομοιόμορφο χρώμα, παρουσία μούχλας ή ανεπιθύμητες οπές, μπορεί επίσης να εμφανιστούν λόγω ασυνεπούς ελέγχου θερμοκρασίας ή κακών πρακτικών υγιεινής. Επιπλέον, το τυρί

μπορεί να υποφέρει από αλλοίωση, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διάρκεια ζωής και η εμφάνιση και η γεύση που δεν είναι ελκυστική. Η αντιμετώπιση αυτών των ελαττωμάτων απαιτεί προσεκτική παρακολούθηση και έλεγχο της διαδικασίας τυροκομίας, από την επιλογή των συστατικών έως την τελική συσκευασία (Karoor & Metzger, 2008).

Ο ροζ αποχρωματισμός, ο οποίος έχει αναφερθεί σε διάφορα είδη τυριών, συμπεριλαμβανομένων των Cheddar, Emmental και Parmesan, είναι ένα παγκόσμιο ζήτημα που επηρεάζει την επιχείρηση τυριών. Αυτός ο ροζ αποχρωματισμός μπορεί να είναι διάσπαρτος σε όλο το τυρί ή να εμφανίζεται ως ταινία κάτω από την επιφάνεια. Έχει προταθεί ότι μια ποικιλία μεταβλητών, συμπεριλαμβανομένων της μικροβιολογικής, μεταβολικής και φυσικής προέλευσης, επηρεάζουν αυτήν την ανεπάρκεια (Yeluri Jonnala et al., 2021).

Η μελέτη των Sattin et al., σε τυρί Ricotta ταυτοποίησε με NGS την παρουσία *Bacillus mycooides* και αναγνωρίστηκε ως το στέλεχος που ευθύνεται για τη σήψη και τον ροζ αποχρωματισμό του τυριού. Αυτή είναι και η πρώτη αναφορά αποχρωματισμού των τροφίμων που προκαλείται από ένα τοξικό στέλεχος (Sattin et al., 2016).

#### **4.4. Μελέτη της ωρίμανσης**

Η NGS έχει φέρει επανάσταση στη μελέτη της ωρίμανσης του τυριού παρέχοντας εις βάθος γνώσεις για τη μικροβιακή δυναμική, τις μεταβολικές δραστηριότητες και τη γενετική έκφραση σε όλη τη διαδικασία ωρίμανσης. Υπάρχουν αρκετά παραδείγματα αναλυόμενων μικροβιωμάτων σχετικά με τις πλατφόρμες τεχνολογιών αλληλούχισης με σύντομες αναγνώσεις. Σε πολλές περιπτώσεις, οι πληροφορίες που αποκτήθηκαν επέτρεψαν επίσης αναλύσεις των μεταβολισμών.

Μία από τις κύριες εφαρμογές του NGS στην παρακολούθηση της ωρίμανσης του τυριού περιλαμβάνει την ανάλυση μικροβιακών κοινοτήτων που υπάρχουν σε δείγματα τυριού σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA που εξάγεται από αυτά τα δείγματα, οι ερευνητές μπορούν να αναγνωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν τη διαφορετική σειρά βακτηρίων, ζυμομυκήτων και μούχλας που συμβάλλουν στην ανάπτυξη γεύσης και στις αλλαγές

υφής κατά την ωρίμανση. Η αξιολόγηση των ρόλων των διαφόρων μικροοργανισμών στη διαδικασία ωρίμανσης καθίσταται δυνατή με την εξαγωγή ολόκληρων γονιδιωμάτων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η πρώτη αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος του *Loigolaktobacillus rennini* ACA-DC 565, ενός βακτηρίου που ταυτοποιήθηκε από το Μάνα, ένα κλασικό ελληνικό υπερωριμασμένο τυρί Κοπανιστή. Ενώ το στέλεχος ACA-DC 565 έχει συνδεθεί με την αλλοίωση του τυριού, πιθανότατα είναι υπεύθυνο για τα ισχυρά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Μάνα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα Illumina HiSeq 2000 (Kazou et al., 2017).

Η ωρίμανση σε ξύλινα ή μεταλλικά δοχεία είναι ζωτικής σημασίας για την παραγωγή του τυριού Φέτα με το χαρακτηριστικό άρωμα και τη γεύση του. Ενώ οι τεχνικές παραγωγής διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο, η ποιότητα των πρώτων υλών επηρεάζει επίσης σημαντικά το τελικό προϊόν. Η ωρίμανση του τυριού φέτα επηρεάζεται τόσο από τις καλλιέργειες εκκίνησης που χρησιμοποιούνται όσο και από τη φυσική μικροχλωρίδα που υπάρχει στο νωπό γάλα. Εμπορικές καλλιέργειες εκκίνησης, όπως *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, χρησιμοποιούνται συνήθως, μαζί με μη εκκινητικά βακτήρια γαλακτικού οξέος (NSLAB) που εμφανίζονται κατά τη διαδικασία ωρίμανσης. Μελέτες έχουν τεκμηριώσει τη μικροχλωρίδα του τυριού φέτα κατά την ωρίμανση, προσδιορίζοντας βασικά NSLAB όπως *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, και εντερόκοκκοι. Η μελέτη των Spyrelli et al. στόχευε να αξιολογήσει την επίδραση των υλικών ωρίμανσης των δοχείων στη βακτηριακή ποικιλότητα στο τυρί φέτα ΠΟΠ αναλύοντας τη μικροχλωρίδα τόσο σε φρέσκο όσο και σε ώριμο τυρί που παράγεται σε πλαστικά και ανοξείδωτα δοχεία χρησιμοποιώντας μικροβιακή απαρίθμηση και αλληλούχιση του γονιδίου 16s rRNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί τόσο στο φρέσκο όσο και στο ώριμο τυρί. Στο φρέσκο τυρί κυριαρχούσε κυρίως ο *Lactococcus*, μαζί με τα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* και το *Pseudomonas*. Σε ώριμα τυριά ωρίμανσης για 54 και 120 ημέρες, το *Lactococcus* παρέμεινε το κυρίαρχο γένος ανεξάρτητα από το υλικό του δοχείου. Επιπλέον, βακτηριακά είδη όπως *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* και *Carnobacterium* ανιχνεύθηκαν τόσο σε φρέσκο όσο και σε ώριμο τυρί. Ενώ μια αριθμητική μείωση στην αφθονία των

*Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae* και *Pseudomonadaceae* παρατηρήθηκε σε ώριμα τυριά που ωριμάστηκαν σε δοχεία από ανοξείδωτο χάλυβα μετά από 120 ημέρες σε σύγκριση με αυτά που ωριμάστηκαν σε πλαστικά δοχεία, αυτές οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές και η μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το υλικό των δοχείων ωρίμανσης δεν επηρεάζει σημαντικά τη μικροβιακή κοινότητα που είναι υπεύθυνη για την ωρίμανση του τυριού φέτα ΠΟΠ (Spyrelli et al., 2020).

Η μετατρανσκριπτομική είναι μια άλλη ισχυρή εφαρμογή της NGS στην έρευνα ωρίμανσης τυριού, που περιλαμβάνει την αλληλούχιση και την ανάλυση μεταγραφών RNA έπειτα από απομόνωση από μικροβιακές κοινότητες. Αυτή η μέθοδος αποκαλύπτει ποια γονίδια εκφράζονται ενεργά κατά την ωρίμανση, παρέχοντας πληροφορίες για τις μεταβολικές οδούς και τις ενζυμικές δραστηριότητες που οδηγούν την ωρίμανση του τυριού (Alegria et al., 2012). Παρακολουθώντας τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, οι ερευνητές μπορούν να διασαφηνίσουν πώς ανταποκρίνονται οι μικροβιακές κοινότητες στις περιβαλλοντικές συνθήκες μέσα στο τυρί, όπως το pH, η περιεκτικότητα σε υγρασία και οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας

Οι δυναμικές αλλαγές των μικροβιακών κοινοτήτων κατά την ωρίμανση του τυριού μπορούν να εξεταστούν μέσω μεταγονιδιωματικής ανάλυσης. Τα κύρια είδη που αποτελούσαν το μικροβίωμα του πυρήνα του τυριού αναγνωρίστηκαν ως *Lactococcus* και *Streptococcus spp.* με ανάλυση μιας πιθανής μικροβιολογικής υπογραφής σε όλη τη διαδικασία ωρίμανσης. Τα είδη γαλακτόκοκκου κυριάρχησαν στους ζυμωτές στην αρχή της ωρίμανσης (66,09%), ακολουθούμενα από τα είδη στρεπτόκοκκου (29,47%). Η σχετική αφθονία του *Streptococcus spp.* αυξήθηκε σημαντικά (88%), ενώ ο *Lactococcus spp.* μειώθηκε δραματικά (8,80%) κοντά στο τέλος της φάσης ωρίμανσης. Η συμπερίληψη μιας αυτόχθονης αρχικής καλλιέργειας ενίσχυσε τη σχετική αφθονία του LAB και μείωσε τα επιβλαβή βακτήρια, σύμφωνα με την αλληλουχία 16S rRNA των βακτηριακών κοινοτήτων νωπού γάλακτος PDO Silter (Silveti et al., 2017).

Η επιλογή και η ικανοποίηση των καταναλωτών καθορίζονται κυρίως από τη γεύση, την υφή και τη συνολική εμφάνιση του τυριού. Η διαδικασία ωρίμανσης, η οποία είναι πολύπλοκη και εξαρτώμενη από το χρόνο και περιλαμβάνει μικροβιολογικές και βιοχημικές αλλαγές που προκαλούνται από τη μεταβολική ροή

καλλιιεργειών εκκίνησης, επικουρικών και μη αρχικών, τη δράση των ενζύμων του γάλακτος και της πυτιάς, καθώς και από μη ενζυματικές μετατροπές, είναι η κύρια διαδικασία μέσω της οποίας αναπτύσσεται η γεύση σε όλες σχεδόν τις ποικιλίες τυριού. Μια σειρά από μικροβιακές κοινότητες εμπλέκονται στη σύνθεση διαφόρων ενώσεων που δίνουν στα τυροκομικά τη γεύση και το άρωμά τους κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και της διαδικασίας παραγωγής (Khattab et al., 2019).

Οι NGS που είναι διαθέσιμες κατέστησαν δυνατή την ενδελεχή ανάλυση των αντίστοιχων γονιδίων προκειμένου να κατανοηθεί η γενετική αστάθεια ορισμένων χαρακτηριστικών, ειδικότερα του αρώματος, και να εντοπιστούν παραλλαγές για κάθε στέλεχος. Από αυτό το πλεονέκτημα, πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική γονιδιωματική έρευνα όλων των πρωτεϊνών - συμπεριλαμβανομένης της δεσμευμένης στο κυτταρικό τοίχωμα πρωτεΐνάσης, των μεταφορέων πεπτιδίων και των πεπτιδασών - που εμπλέκονται στο πρωτεολυτικό σύστημα 22 στελεχών LAB με πλήρη αλληλούχιση. Τα ευρήματα έδειξαν ότι ένας συγκριτικά μεγαλύτερος αριθμός γονιδίων που σχετίζονται με την πρωτεόλυση κωδικοποιήθηκαν στα γονιδιώματα των στελεχών των *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasserii* και *Lactobacillus helveiticus*. Επιπλέον, τα χρωμοσώματα των στελεχών των *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus cremoris* ήταν τα μόνα που περιλάμβαναν την πρωτεΐνάση του κυτταρικού τοιχώματος (Liu et al., 2010).

Οι Zheng et al. χρησιμοποίησαν αλληλουχία αμπλικονίου (16S rRNA και τόποι ITS) για τη μελέτη της ποικιλότητας των μικροβίων και SPME GC-MS για τη διερεύνηση ουδέτερων πτητικών οργανικών ενώσεων και πτητικών λιπαρών οξέων για τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ της μικροβιακής δυναμικής, της εξέλιξης και της δημιουργίας γεύσης κατά την ωρίμανση του βιοτεχνικού τυριού Kazak. Οκτώ είδη βακτηρίων και επτά μύκητες βρέθηκαν σε όλη τη διαδικασία ωρίμανσης του τυριού Kazak, με τον *Lactobacillus* και τον *Streptococcus*, μαζί με τον *Kluyveromyces* και τον *Torulaspora*, να είναι τα πιο διαδεδομένα σε κάθε στάδιο. Μια ποικιλία βακτηριακών κατηγοριών και ζυμομυκήτων θεωρήθηκαν ως η λειτουργική μικροχλωρίδα του πυρήνα που είναι υπεύθυνη για την παραγωγή πτητικών, λιπαρών οξέων και αμινοξέων τα οποία χαρακτηρίζουν τη γεύση και το άρωμα του συγκεκριμένου



τυριού. Οι σταφυλόκοκκοι, οι βάκιλοι, οι γαλακτοβάκιλλοι και οι *Kluyveromyces* έδειξαν θετικές συσχετίσεις με τη 2-νονανόνη, την ακετοΐνη και τη βενζαλδεΐδη. Ενώ τα στελέχη *Issatchenkia* και *Candida* έδειξαν θετικές συσχετίσεις με το βουτανοϊκό οξύ και το ν-δεκανοϊκό οξύ (Zheng et al., 2018).

Προκειμένου να διερευνηθεί η διαδοχή της μικροχλωρίδας του φλοιού και η μεταβολική ικανότητα σε επιφανειακά ώριμα τυριά, οι Bertuzzi et al. χρησιμοποίησαν αλληλούχισή shotgun. Στη συνέχεια συνέδεσαν αυτές τις πληροφορίες με πτητικές χημικές ουσίες που βρέθηκαν χρησιμοποιώντας το HS-SPME GC-MS. Βρέθηκαν συσχετίσεις μεταξύ του *D. hansenii* και του μεταβολισμού των FAA και FFA, αλκοολών και καρβοξυλικών οξέων, ενώσεων θείου και 2-μεθυλ-1-βουτανόλης με τα *Brevibacterium linens*, *G. candidum* και *Staphylococcus xylosus*. Των κετονών με *Corynebacterium variabile* και *Glutamicibacter arilaitensis* (Bertuzzi et al., 2018).

#### 4.5. Μελέτη της αλλοίωσης

Ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων προκαλούν υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων και των ποτών. Τόσο το περιβάλλον όσο και η οικονομία υποφέρουν όταν τα τρόφιμα χαλάνε. Οι ακριβείς εκτιμήσεις των βακτηρίων αυτών αποτελούν πρόκληση, παρόμοια με την έρευνα για τη βιοποικιλότητα διαφορετικών ποικιλιών τροφίμων. Ως εκ τούτου, πιστεύεται ότι απαιτούνται πιο προηγμένες μέθοδοι ποσοτικοποίησης. Παρόλο που ορισμένες μελέτες χρησιμοποίησαν μάλλον εξελιγμένα συστήματα για να συναγάγουν τη σχετική αφθονία των ταξινομικών ομάδων από τις αναγνώσεις NGS, σε περιπτώσεις όπου τα αλλοιωγόνα έχουν μελετηθεί τόσο με συστήματα εξαρτώμενα από την καλλιέργεια όσο και με μεταγενετικά συστήματα, φάνηκε ότι τα τελευταία χρησιμεύουν περισσότερο για να δώσουν μια επισκόπηση και μια πιο ακριβή εκτίμηση (Hultman et al., 2015).

Παραλλαγές στη δραστηριότητα της καλλιέργειας εκκίνησης και στα προφίλ οξύτητας, στις διαδικασίες υγιεινής, στην προεπεξεργασία γάλακτος (παστερίωση), στην τεχνική παρασκευής, στις παραμέτρους σύνθεσης, στη θερμοκρασία και στο περιβάλλον ωρίμανσης μπορούν όλα να οδηγήσουν σε ελαττώματα στο τυρί. Επιπλέον, λόγω του γεγονότος ότι οι παραγωγοί προσπάθησαν να μειώσουν την

ποσότητα αλατιού στο τυρί ανταποκρινόμενοι στη ζήτηση της αγοράς αυτό έχει ως αποτέλεσμα μια αισθητή αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης ελαττωμάτων του τυριού που αποδίδεται στον αυξημένο βακτηριακό πολλαπλασιασμό (McSweeney, 2007).

Ένας σημαντικός παράγοντας αλλοίωσης είναι η θερμοκρασία συντήρησης. Γενικά, η αλλοίωση του φρέσκου τυριού ορού γάλακτος δεν μπορεί να αποφευχθεί μόνο με ψύξη ή σε συνδυασμό με συσκευασία υπό κενό. Για να αυξηθεί η διάρκεια ζωής και η ασφάλεια των φρέσκων (ελληνικών) τυριών ορού γάλακτος, πρέπει να εφαρμόζονται πρόσθετα μέτρα στη συσκευασία, επειδή ορισμένα μικροαερόφιλα βακτήρια αλλοίωσης, όπως τα ψυχρότροφα *Enterobacteriaceae* και παθογόνα όπως το *L. monocytogenes*, διατηρούν υψηλό δυναμικό ανάπτυξης υπό συνθήκες ψυχρής αποθήκευσης και κενού (Pintado et al., 2001).

Η μελέτη των Sameli et al., ποσοτικοποίησε την ανάπτυξη και χαρακτήρισε τα κύρια βακτήρια αλλοίωσης σε δείγματα φρέσκου Ανθότυρου που αποθηκεύτηκαν στους 4 °C σε κενό για 40 ημέρες, χωρίς ή με προσθήκη 5% (v/w) ακατέργαστου εκχυλίσματος εντεροκίνης A-B-P (CentE). Για την ποσοτικοποίηση και τον χαρακτηρισμό χρησιμοποίησαν την αλληλούχηση των περιοχών V1-V9 του γονιδίου 16S rRNA. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι τα ψυχρότροφα βακτήρια *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Hafnia spp.* και *Serratia spp.* αναπτύχθηκαν ταχύτερα από το LAB κατά την πρώιμη αποθήκευση. Ωστόσο, ο αριθμός των LAB ξεπέρασε τα Gram-αρνητικά βακτήρια και επικράτησε από τη μέση έως όψιμη αποθήκευση σε όλες τις παρτίδες τυριού, προκαλώντας μια ισχυρή ή ηπιότερη φυσική οξίνιση που εξαρτάται από τις παρτίδες. Επίσης σε χαμηλό ποσοστό ανιχνεύθηκαν τα στελέχη *Carnobacterium maltaromaticum*, *Leuconostoc lactis*, μεσόφιλοι *Lactobacillus* και *Enterococcus* (Sameli et al., 2021).

Χρησιμοποιώντας τόσο την NGS όσο και την qPCR, διεξήχθη έρευνα σχετικά με τις επιπτώσεις της θερμοκρασίας μαγειρέματος, της οξύτητας και της προσθήκης καλλιέργειας εκκίνησης στην ανάπτυξη επιβλαβών βακτηρίων, όπως *E. Coli*, *Listeria innocua* και *S. aureus*, σε τέσσερα εμβολιασμένα τυριά. Τα ευρήματα έδειξαν ότι οι μετρήσεις του *E. coli* αυξήθηκαν μέχρι την έβδομη ημέρα ωρίμανσης, οπότε και έπεσαν. Οι συμπληρωματικοί εκκινητές *Microbacterium lacticum* και *Brevibacteria linens* δεν είχαν καμία επίδραση στην ανάπτυξη των παθογόνων στελεχών κατά την ωρίμανση.

Οι μεγάλες περίοδοι ωρίμανσης, που είναι τυπικές για την παρασκευή σκληρών τυριών, παρέχουν το ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών καθ' όλη τη διάρκεια της γαλακτοκομικής διαδικασίας. Αυτό μπορεί να έχει θετικές επιπτώσεις ή, από την άλλη πλευρά, να προκαλέσει σφάλματα αλλοίωσης που βλάπτουν το τελικό προϊόν. Ένα από τα πιο κοινά ζητήματα που εξακολουθεί να επηρεάζει την παραγωγή σκληρού τυριού στις γαλακτοκομικές εγκαταστάσεις είναι το όψιμο φύσημα. Ο σχηματισμός σπορίων κλωστριδίου θεωρείται ότι είναι η κύρια αιτία αυτών των βλαβών χάρη στην ανθεκτικότητα των σπορίων στη θερμική επεξεργασία και στην αυξημένη ικανότητά τους να βλασταίνουν κατά την ωρίμανση του τυριού. Η φθορά του σκληρού τυριού έχει συνδεθεί με διάφορα είδη κλωστριδίων, συμπεριλαμβανομένου του *Clostridium tyrobutyricum*, που είναι ο κύριος ένοχος, του *Clostridium butyricum*, του *Clostridium beijerinckii* και, λιγότερο συχνά, του *Clostridium cochlearium*, του *Clostridium perfringens* και του *Clostridium sep* (Gómez-Torres et al., 2015).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα συνδέονται συχνά με τη μόλυνση του ανθρώπου με *Listeria monocytogenes*, μια επικίνδυνη μολυσματική ασθένεια με ένα από τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας (20%) μεταξύ ασθενειών που προκαλούνται από βακτηριακά τροφιογενή παθογόνα. Η έρευνα των Andritsos et al., περιελάμβανε τον φαινοτυπικό και γενετικό χαρακτηρισμό 54 στελεχών *L. monocytogenes* που ελήφθησαν μέσω αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) από τη Μυζήθρα. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει 48 απομονώσεις και επιχρίσματα που ελήφθησαν από τις επιφάνειες μιας μονάδας επεξεργασίας τυριού στη περιοχή της Ηπείρου. Η πλειονότητα των απομονώσεων ταξινομήθηκε ως στελέχη PCR-οροομάδας IIb (44/54, 81,5%· ορ. 1/2b, 3b, 7), ακολουθούμενη από την PCR-οροομάδα IIa (9/54, 16,7%· ορ. 1/2a, 3a) και στελέχη PCR-οροομάδας IVb (1/54, 1,8%, ser. 4b, 4d, 4e) (Andritsos & Mataragas, 2023).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα τυριά ορού γάλακτος αντιπροσωπεύουν μια ξεχωριστή κατηγορία στη γαλακτοβιομηχανία, που χαρακτηρίζεται από τη μοναδική διαδικασία παραγωγής και το διατροφικό τους προφίλ. Αυτά τα τυριά, που προέρχονται από τον ορό γάλακτος που απομένει μετά την παραγωγή άλλων τυριών όπως η ρικότα ή το ελληνικό γιαούρτι, αποτελούν παράδειγμα βιώσιμων πρακτικών τροφίμων χρησιμοποιώντας αυτό που διαφορετικά θα ήταν υποπροϊόν. Η παραγωγή τυριών ορού γάλακτος περιλαμβάνει τη συμπύκνωση του ορού γάλακτος μέσω θέρμανσης και οξίνισης, η οποία καθιζάνει πρωτεΐνες και δημιουργεί ένα τυρόπηγμα που στη συνέχεια πλάθεται και ωριμάζει.

Τα τυριά ορού γάλακτος προσφέρουν ένα φάσμα γεύσεων και υφών, που κυμαίνονται από ήπια και κρεμώδη έως πικάντικα και εύθρυπτα, ανάλογα με παράγοντες όπως οι τεχνικές επεξεργασίας και οι συνθήκες παλαίωσης. Η ευελιξία τους στις μαγειρικές εφαρμογές τα καθιστά κατάλληλα τόσο για αλμυρά πιάτα όσο και για επιδόρπια, συμβάλλοντας στη δημοτικότητά τους σε διάφορες κουζίνες παγκοσμίως. Διατροφικά, είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και μέταλλα, προσφέροντας μια πλούσια σε θρεπτικά συστατικά εναλλακτική λύση στα παραδοσιακά τυριά. Εκτιμώνται ιδιαίτερα για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες και το ευεργετικό προφίλ αμινοξέων τους, το οποίο υποστηρίζει την ανάπτυξη και την επισκευή των μυών, καθιστώντας τα ελκυστικά για τους καταναλωτές που προσέχουν την υγεία τους.

Εκτός από τα ευεργετικά διατροφικά στοιχεία το τυρόγαλα αποτελεί ένα καλό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων τόσο ευεργετικών όσο και παθογόνων. Η κατανόηση των μικροβιακών κοινοτήτων που εμπλέκονται στην παραγωγή τυριού ορού γάλακτος είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της συνέπειας στη γεύση και την υφή, καθώς και για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Παραδοσιακά, μέθοδοι που βασίζονται σε καλλιέργεια έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση αυτών των μικροβιακών κοινοτήτων. Ωστόσο, έχουν περιορισμούς στην αποτύπωση της πλήρους ποικιλομορφίας και δυναμικής της υπάρχουσας μικροχλωρίδας.

Η NGS έφερε επανάσταση στη μελέτη της παραγωγής τυριού και τυριού ορού γάλακτος, προσφέροντας πρωτοφανείς γνώσεις για τις μικροβιακές κοινότητες και τη

γενετική ποικιλομορφία που σχετίζονται με αυτά τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Οι τεχνολογίες NGS, όπως η αλληλουχία Illumina, το Ion Torrent και το PacBio, επέτρεψαν στους ερευνητές να εξερευνήσουν μικροβιακά οικοσυστήματα στο τυρί σε βάθος και ανάλυση που δεν ήταν εφικτή με τις παραδοσιακές μεθόδους. Με τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA και του RNA που εξάγεται από δείγματα τυριού και ορού γάλακτος, το NGS παρέχει μια ολοκληρωμένη εικόνα της μικροβιακής σύνθεσης, συμπεριλαμβανομένων τόσο των κυρίαρχων ειδών όσο και των σπάνιων μικροοργανισμών που συμβάλλουν στις πολύπλοκες διαδικασίες ζύμωσης και ωρίμανσης του τυριού.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της NGS στην παραγωγή τυριού είναι η ικανότητά να αποκαλύπτει τη μικροβιακή ποικιλομορφία και τη δυναμική σε διάφορα στάδια παραγωγής τυριού. Αυτό περιλαμβάνει την κατανόηση του τρόπου με τον οποίο εξελίσσονται οι μικροβιακές κοινότητες κατά τη ζύμωση, την ωρίμανση και την αποθήκευση, επηρεάζοντας τα αισθητηριακά χαρακτηριστικά και την ποιότητα του τελικού προϊόντος. Με τον εντοπισμό των μικροβιακών ειδών και των μεταβολικών τους οδών, το NGS βοηθά στην αποσαφήνιση του ρόλου τους στην ανάπτυξη γεύσης, την τροποποίηση της υφής και την επέκταση της διάρκειας ζωής των τυριών. Αυτές οι πληροφορίες είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτιστοποίηση των πρακτικών παραγωγής και την ανάπτυξη νέων ποικιλιών τυριού με επιθυμητά γευστικά προφίλ και χαρακτηριστικά.

Επιπλέον, η NGS διευκολύνει την ανίχνευση πιθανών παθογόνων και οργανισμών αλλοίωσης στο τυρί και τον ορό γάλακτος, ενισχύοντας έτσι την ασφάλεια των τροφίμων και τα μέτρα ποιοτικού ελέγχου. Ο γρήγορος εντοπισμός μικροβιακών ρύπων μπορεί να αποτρέψει την αλλοίωση και να διασφαλίσει ότι τα τυριά πληρούν αυστηρά πρότυπα ασφάλειας τροφίμων. Επιπλέον, το NGS επιτρέπει την παρακολούθηση των μικροβιακών κοινοτήτων σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας στους παραγωγούς να επέμβουν άμεσα για να διατηρήσουν τη συνοχή του προϊόντος και να μετριάσουν τους κινδύνους που σχετίζονται με ανεπιθύμητες μικροβιακές δραστηριότητες.

Η ενσωμάτωση της NGS με άλλες τεχνολογίες ωμικής, όπως η μετατρανσκριπτομική και η μεταβολομική, ενισχύει περαιτέρω την κατανόησή μας για τις λειτουργικές ικανότητες της μικροχλωρίδας που σχετίζεται με το τυρί. Αυτή η

προσέγγιση multi-omics παρέχει πληροφορίες για τα πρότυπα έκφρασης μικροβιακών γονιδίων και τα προφίλ μεταβολιτών, συνδέοντας τις μικροβιακές δραστηριότητες με τα χαρακτηριστικά ποιότητας του τυριού. Αποκρυπτογραφώντας το γενετικό δυναμικό και τις μεταβολικές δραστηριότητες της μικροχλωρίδας του τυριού, το NGS υποστηρίζει στοχευμένες στρατηγικές για τη βελτίωση της παραγωγικής αποδοτικότητας, της βιωσιμότητας και της συνολικής αισθητηριακής εμπειρίας των τυριών.

Προσβλέποντας στο μέλλον, εξακολουθούν να υπάρχουν προκλήσεις στην εφαρμογή της NGS στην παραγωγή τυριού και ειδικότερα τυριών τυρογάλακτος, συμπεριλαμβανομένης της πολυπλοκότητας της ανάλυσης δεδομένων, της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας και της ανάγκης για εξειδικευμένη τεχνογνωσία στη βιοπληροφορική. Οι μελλοντικές ερευνητικές προσπάθειες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην υπέρβαση αυτών των προκλήσεων για να διευρυνθεί η εφαρμογή του NGS σε διάφορα συστήματα παραγωγής τυριού, συμπεριλαμβανομένων βιοτεχνικών και μικρής κλίμακας επιχειρήσεων. Οι συνεχείς εξελίξεις στις τεχνολογίες NGS και στα εργαλεία βιοπληροφορικής θα οδηγήσουν περαιτέρω την καινοτομία στη μικροβιολογία του τυριού, προσφέροντας ευκαιρίες για βελτίωση της ποιότητας, της ασφάλειας και της ποικιλομορφίας των προϊόντων στην παγκόσμια γαλακτοκομική βιομηχανία.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abreu, A. C. da S., Carazzolle, M. F., Crippa, B. L., Barboza, G. R., Mores Rall, V. L., de Oliveira Rocha, L., & Silva, N. C. C. (2021). *Bacterial diversity in organic and conventional Minas Frescal cheese production using targeted 16S rRNA sequencing. International Dairy Journal, 122, 105139.* doi:10.1016/j.idairyj.2021.105139.
2. Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2018). *Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–15.* doi:10.1080/10408398.2018.1512471
3. Akintunde, O., Tucker, T., & Carabetta, V. J. (2023). The evolution of next-generation sequencing technologies. *ArXiv*, arXiv:2305.08724v1.
4. Altieri, C., Ciuffreda, E., Di Maggio, B., & Sinigaglia, M. (2017). Lactic acid bacteria as starter cultures. *Starter cultures in food production, 1-15.*
5. Andrikopoulos, N. K., Kalogeropoulos, N., Zerva, A., Zerva, U., Hassapidou, M., & Kapoulas, V. M. (2003). Evaluation of cholesterol and other nutrient parameters of Greek cheese varieties. *Journal of food composition and analysis, 16(2), 155-167.*
6. Andritsos, N. D., & Mataragas, M. (2023). Characterization and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Greek Myzithra Soft Whey Cheese and Related Food Processing Surfaces over Two-and-a-Half Years of Safety Monitoring in a Cheese Processing Facility. *Foods (Basel, Switzerland), 12(6), 1200.* <https://doi.org/10.3390/foods12061200>.
7. Ari, Ş., & Arikan, M. (2016). Next-generation sequencing: advantages, disadvantages, and future. *Plant omics: Trends and applications, 109-135.*
8. Bassi, D., Puglisi, E., & Cocconcelli, P. S. (2015). *Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. Food Microbiology, 52, 106–118.* doi:10.1016/j.fm.2015.07.004.
9. Belkadi, A., Bolze, A., Itan, Y., Cobat, A., Vincent, Q. B., Antipenko, A., ... & Abel, L. (2015). Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(17), 5473-5478.*

10. Bellassi, P., Rocchetti, G., Maldarizzi, G., Braceschi, G. P., Morelli, L., Lucini, L., & Cappa, F. (2021). Case Study on the Microbiological Quality, Chemical and Sensorial Profiles of Different Dairy Creams and Ricotta Cheese during Shelf-Life. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(11), 2722. <https://doi.org/10.3390/foods10112722>. Fox, P.F. (1993). Cheese: An Overview. In: Fox, P.F. (eds) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2650-6_1).
11. Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kausrud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology*, 10, 189. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-189>
12. Belsito, P. C., Ferreira, M. V. S., Cappato, L. P., Cavalcanti, R. N., Vidal, V. A. S., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Balthazar, C. F., Neto, R. P. C., Tavares, M. I. B., Zacarchenco, P. B., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Pastore, G. M., Pollonio, M. A. R., & Cruz, A. G. (2017). Manufacture of Requeijão cremoso processed cheese with galactooligosaccharide. *Carbohydrate polymers*, 174, 869–875. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.021>.
13. Bennato, F., Ianni, A., Grotta, L., & Martino, G. (2022). Evaluation of Chemical-Nutritional Characteristics of Whey and Ricotta Obtained by Ewes Fed Red Grape Pomace Dietary Supplementation. *Food science of animal resources*, 42(3), 504–516. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e20>.
14. Bertani, G., Levante, A., Lazzi, C., Bottari, B., Gatti, M., & Neviani, E. (2020). Dynamics of a natural bacterial community under technological and environmental pressures: The case of natural whey starter for Parmigiano Reggiano cheese. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 129, 108860. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108860>.
15. Bertuzzi, A. S., Walsh, A. M., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., Crispie, F., McSweeney, P. L. H., ... & Rea, M. C. (2018). Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese. *mSystems* 3
16. Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International dairy journal*, 11(4-7), 259-274.



17. Bintsis, T.; Papademas, P. (2023). Sustainable Approaches in Whey Cheese Production: A Review. *Dairy*, 4, 249-270. <https://doi.org/10.3390/dairy4020018>.
18. Bintsis, T., Mantzouridou, F. T., Lalou, S., & et al. (2024). Correction: Comparative analysis of chemical, microbiological, sensory and volatile compound profiles in Manouri PDO and artisanal Manouri cheeses: A preliminary study. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03356-6>.
19. Bodinaku, I., Shaffer, J., Connors, A. B., Steenwyk, J. L., Biango-Daniels, M. N., Kastman, E. K., ... & Wolfe, B. E. (2019). Rapid Phenotypic and Metabolomic Domestication of Wild *Penicillium* Molds on Cheese. *MBio*. 10: e02445-19.
20. Buermans, H. P. J., & Den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(10), 1932-1941.
21. Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K., & Srikumar, S. (2017). A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Frontiers in microbiology*, 8, 1829. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01829>.
22. Cameron, E. S., Schmidt, P. J., Tremblay, B. J., Emelko, M. B., & Müller, K. M. (2021). Enhancing diversity analysis by repeatedly rarefying next generation sequencing data describing microbial communities. *Scientific reports*, 11(1), 22302. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01636-1>.
23. Cardin, M., Cardazzo, B., Mounier, J., Novelli, E., Coton, M., & Coton, E. (2022). Authenticity and Typicity of Traditional Cheeses: A Review on Geographical Origin Authentication Methods. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(21), 3379. <https://doi.org/10.3390/foods11213379>
24. Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M. E., Novelli, E., Frigo, F., ... Cardazzo, B. (2011). *Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. Research in Microbiology*, 162(3), 231–239. doi:10.1016/j.resmic.2011.01.002.
25. Castellana, S., Bianco, A., Capozzi, L., Del Sambro, L., Simone, D., Iammarino, M., ... & Parisi, A. (2023). Microbial Community Profiling from Natural Whey Starter to Mozzarella among Different Artisanal Dairy Factories in Apulia Region (Italy). *Fermentation*, 9(10), 911.

26. Casti, D., Scarano, C., Pala, C., Cossu, F., Lamon, S., Spanu, V., Ibba, M., Mocci, A. M., Tedde, F., Nieddu, G., Spanu, C., & De Santis, E. P. (2016). Evolution of the Microbiological Profile of Vacuum-Packed *Ricotta Salata* Cheese During Shelf-Life. *Italian journal of food safety*, 5(2), 5501. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5501>.
27. Chavan, R.S., Rc, S., Kumar, A., & Nalawade, T. (2015). Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. *Journal of Food Processing and Technology*, 6, 1-8.
28. Chemidlin Prévost-Bouré, N., Karimi, B., Sadet-Bourgeteau, S., Djemiel, C., Brie, M., Dumont, J., Campedelli, M., Nowak, V., Guyot, P., Letourneur, C., Manneville, V., Gillet, F., & Bouton, Y. (2021). Microbial transfers from permanent grassland ecosystems to milk in dairy farms in the Comté cheese area. *Scientific reports*, 11(1), 18144. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97373-6>
29. Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862
30. Danezis, G., Theodorou, C., Massouras, T., Zoidis, E., Hadjigeorgiou, I., & Georgiou, C. A. (2019). Greek Graviera Cheese Assessment through Elemental Metabolomics-Implications for Authentication, Safety and Nutrition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(4), 670. <https://doi.org/10.3390/molecules24040670>
31. Da Silva Duarte, V., Carlot, M., Pakroo, S., Tarrah, A., Lombardi, A., Santiago, H., ... Giacomini, A. (2020). Comparative evaluation of cheese whey microbial composition from four Italian cheese factories by viable counts and 16S rRNA gene amplicon sequencing. *International Dairy Journal*, 104656. doi:10.1016/j.idairyj.2020.104656.
32. European Union, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R2018>.
33. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, 151(2), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>.

34. Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Fundamentals of cheese science.
35. Froeschke, G., & von der Heyden, S. (2014). *A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host–Parasite Relationships. Advances in Parasitology, 209–252.* doi:10.1016/b978-0-12-800099-1.00004-1
36. Fuka, M. M., Wallisch, S., Engel, M., Welzl, G., Havranek, J., & Schloter, M. (2013). Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLoS One, 8*(11), e80734.
37. Garcia, M.M.E., Pereira, C.J.D., Freitas, A.C., Gomes, A.M.P., and Pintado, M.M.E. (2022). Development and Characterization of a Novel Sustainable Probiotic Goat Whey Cheese Containing Second Cheese Whey Powder and Stabilized with Thyme Essential Oil and Sodium Citrate. *Foods, 11*(17), 2698.
38. Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., & Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of dairy science, 97*(2), 573-591.
39. Gimonkar, S., Van Fleet, E., & Boys, K. A. (2021). Food Fraud.
40. Gobbetti, M., Neviani, E., Fox, P. (2018). Classification of Cheese. In: *The Cheeses of Italy: Science and Technology.* Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-89854-319-89854>.
41. Gómez-Torres, N., Garde, S., Peiroten, Á., & Ávila, M. (2015). *Impact of Clostridium spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. Food Control, 56, 186–194.* doi:10.1016/j.foodcont.2015.03.02.
42. Gupta, S., Mortensen, M. S., Schjørring, S., Trivedi, U., Vestergaard, G., Stokholm, J., Bisgaard, H., Krogfelt, K. A., & Sørensen, S. J. (2019). Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Communications biology, 2,* 291. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0540-1>.
43. György, É., & Laslo, É. (2021). Microbial Diversity of Traditionally Processed Cheese from Northeastern Region of Transylvania (Romania). *IntechOpen.* doi: 10.5772/intechopen.97591

44. Hert, D. G., Fredlake, C. P., & Barron, A. E. (2008). Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: a comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods. *Electrophoresis*, *29*(23), 4618-4626.
45. Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology*, *82*(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>.
46. Hultman, J., Rahkila, R., Ali, J., Rousu, J., & Björkroth, K. J. (2015). Meat processing plant microbiome and contamination patterns of cold-tolerant bacteria causing food safety and spoilage risks in the manufacture of vacuum-packaged cooked sausages. *Applied and environmental microbiology*, *81*(20), 7088-7097.
47. Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). *Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety*. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(2), 142–148. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016.
48. Johnson, M. E. (2017). *A 100-Year Review: Cheese production and quality*. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 9952–9965. doi:10.3168/jds.2017-12979
49. Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B. Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature communications*, *10*(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
50. Kamilari, E., Tomazou, M., Antoniadou, A., & Tsaltas, D. (2019). High Throughput Sequencing Technologies as a New Toolbox for Deep Analysis, Characterization and Potentially Authentication of Protection Designation of Origin Cheeses?. *International journal of food science*, *2019*, 5837301. <https://doi.org/10.1155/2019/5837301>.
51. Kaminarides, S. (2015). A modified form of Myzithra cheese produced by substituting the fresh cheese whey by dried whey protein concentrate and ovine milk and cream. *Small Ruminant Research*, *131*, 118-122.
52. Kapoor, R., & Metzger, L. E. (2008). *Process Cheese: Scientific and Technological Aspects—A Review*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *7*(2), 194–214. doi:10.1111/j.1541-4337.2008.00040.x

53. Kapoor, R., Metzger, L. E., Biswas, A. C., & Muthukummarappan, K. (2007). Effect of natural cheese characteristics on process cheese properties. *Journal of Dairy Science*, *90*(4), 1625-1634.
54. Kazou, M., Alexandraki, V., Pot, B., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2017). Whole-genome sequence of the cheese isolate *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565. *Genome Announcements*, *5*(5), 10-1128.
55. Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 343-360.
56. Khezri, S., Seyedsaleh, M. M., Emami, N., & Dehghan, P. (2016). Whey: characteristics, applications and health aspects. In *Third International Conference on Science and Engineering held on 2nd June*.
57. Kindstedt, P. S. (2017). *The History of Cheese. Global Cheesemaking Technology*, 1–19. doi:10.1002/9781119046165.ch
58. Kircher, M., & Kelso, J. (2010). *High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. BioEssays*, *32*(6), 524–536. doi:10.1002/bies.200900181.
59. Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). *The fungal problem in cheese industry. Current Opinion in Food Science*. doi:10.1016/j.cofs.2019.07.0
60. Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, *28*(1), 208-236.
61. Lahens, N.F., Ricciotti, E., Smirnova, O.V., Toorens, E., Kim, E.J., Baruzzo, G., Hayer, K.E., Ganguly, T.K., Schug, J., & Grant, G.R. (2017). A comparison of Illumina and Ion Torrent sequencing platforms in the context of differential gene expression. *BMC Genomics*, *18*.
62. Lioliou, K., Litopoulou-Tzanetaki, E. Tzanetakis, N. & Robinson, R. K. (2001). Changes in the microflora of manouri, a traditional Greek whey cheese, during storage. *International Journal of Dairy Technology*, *54* (3), 100–106.
63. Lorieau, L., Halabi, A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (2018). *Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino*

- acid bioaccessibility during in vitro digestion. Food Hydrocolloids, 82, 399–411. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.04.019.*
64. Mancuso, I., Cardamone, C., Fiorenza, G., Macaluso, G., Arcuri, L., Miraglia, V., & Scatassa, M. L. (2014). Sensory and microbiological evaluation of traditional ovine ricotta cheese in modified atmosphere packaging. *Italian Journal of Food Safety, 3*(2).
  65. Mangione, G., Caccamo, M., Natalello, A., & Licitra, G. (2023). Graduate Student Literature Review: History, technologies of production, and characteristics of ricotta cheese. *Journal of Dairy Science*.
  66. Marino, M., Innocente, N., Maifreni, M., Mounier, J., Cobo-Díaz, J. F., Coton, E., ... & Cardazzo, B. (2017). Diversity within Italian cheesemaking brine-associated bacterial communities evidenced by massive parallel 16S rRNA gene tag sequencing. *Frontiers in Microbiology, 8*, 2119.
  67. McSweeney, P. L. H. (2007). *Cheese Problems Solved*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
  68. Mignardi, M., & Nilsson, M. (2014). Fourth-generation sequencing in the cell and the clinic. *Genome medicine, 6*, 1-4.
  69. Moatsou, G., Hatzinaki, A., Samolada, M., & Anifantakis, E. (2005). Major whey proteins in ovine and caprine acid wheys from indigenous Greek breeds. *International dairy journal, 15*(2), 123-131.
  70. Monnet, C., Landaud-Liautaud, S., Bonnarne, P., & Swennen, D. (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS microbiology letters, 362*(1), 1-9.
  71. Mucchetti, G., & Neviani, E. (2006). *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia*. Tecniche nuove.
  72. Mucchetti, G., Pugliese, A., & Paciulli, M. (2017). Characteristics of some important Italian cheeses: Parmigiano reggiano, grana padano, mozzarella, mascarpone and ricotta. In *Mediterranean Foods* (pp. 1-34). CRC Press.
  73. Mukherjee, P., Raj, N., & Sivaprakasam, S. (2023). Harnessing valorization potential of whey permeate for D-lactic acid production using lactic acid bacteria. *Biomass Conversion and Biorefinery, 13*, 15639–15658. <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05038-3>

74. Nakano, K., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N., Ohki, S., Shinzato, M., Minami, M., Nakanishi, T., Teruya, K., Satou, K., & Hirano, T. (2017). Advantages of genome sequencing by long-read sequencer using SMRT technology in medical area. *Human cell*, *30*(3), 149–161. <https://doi.org/10.1007/s13577-017-0168-8>.
75. Oehler, J. B., Wright, H., Stark, Z., Mallett, A. J., & Schmitz, U. (2023). The application of long-read sequencing in clinical settings. *Human genomics*, *17*(1), 73.
76. Ortiz Araque, L. C., Darré, M., Ortiz, C. M., Massolo, J. F., & Vicente, A. R. (2017). Quality and yield of Ricotta cheese as affected by milk fat content and coagulant type. *International Journal of Dairy Technology*, *71*(2), 340–346. doi:10.1111/1471-0307.12431.
77. Papademas, P., & Bintsis, T. (Eds.). (2017). *Global cheesemaking technology: cheese quality and characteristics*. John Wiley & Sons.
78. Papademas, P., Bintsis, T., Alichanidis, E., & Ardö, Y. (2017). Whey Cheeses (Heat Coagulated). *Global Cheesemaking Technology*, 446–452. doi:10.1002/9781119046165.ch13.
79. Papadakis, P., Konteles, S., Batrinou, A., Ouzounis, S., Tsironi, T., Halvatsiotis, P., Tsakali, E., Van Impe, J. F. M., Vougiouklaki, D., Strati, I. F., & Houhoula, D. (2021). Characterization of Bacterial Microbiota of P.D.O. Feta Cheese by 16S Metagenomic Analysis. *Microorganisms*, *9*(11), 2377. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112377>.
80. Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Bounenni, R., Paximadaki, A., Charmpi, C., Alexandraki, V., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2022). Comparison of the microbiome of artisanal homemade and industrial feta cheese through amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Microorganisms*, *10*(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051073>.
81. Park, W., Yoo, J., Oh, S., Ham, J. S., Jeong, S. G., & Kim, Y. (2019). Microbiological Characteristics of Gouda Cheese Manufactured with Pasteurized and Raw Milk during Ripening Using Next Generation Sequencing. *Food science of animal resources*, *39*(4), 585–600. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e49>.

82. Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: an update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial genomics*, 6(8), mgen000409. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409>.
83. Persing, D. H. (2016). *Molecular Microbiology DIAGNOSTIC PRINCIPLES AND PRACTICE THIRD EDITION*. ASM press.
84. Pervez, M. T., Hasnain, M. J. U., Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., & Shah, S. S. M. (2022). A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *BioMed research international*, 2022, 3457806. <https://doi.org/10.1155/2022/3457806> (Retraction published Biomed Res Int. 2024 Jan 9;2024:9837802. doi: 10.1155/2024/9837802)
85. Pintado, M. E., Macedo, A. C., & Malcata, F. X. (2001). Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7(2), 105-116.
86. Pintado, M. E., da Silva, J. A. L., & Malcata, F. X. (1996). *Characterization of Requeijão and technological optimization of its manufacturing process*. *Journal of Food Engineering*, 30(3-4), 363–376. doi:10.1016/s0260-8774(96)00016-7.
87. Pires, A. F., Marnotes, N. G., Rubio, O. D., Garcia, A. C., & Pereira, C. D. (2021). Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(5), 1067. <https://doi.org/10.3390/foods10051067>
88. Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 664-698.
89. Ramos, G.L., Guimarães, J.D., Pimentel, T.C., Cruz, A.G., Souza, S.L., & Vendramel, S.M. (2021). Whey: generation, recovery, and use of a relevant by-product. *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products*.
90. Rhoads, A., & Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>.
91. Ribani, A., Schiavo, G., Utzeri, V. J., Bertolini, F., Geraci, C., Bovo, S., & Fontanesi, L. (2018). Application of next generation semiconductor based sequencing for



- species identification in dairy products. *Food chemistry*, 246, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.006>
92. Robinson, R. K., & Wilbey, R. A. (1998). Cheese whey and its uses. *Cheesemaking Practice*. Boston, MA: Springer.
  93. Rocha, J. M., & Guerra, A. (2020). On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry by-product: an overview. *European Food Research and Technology*, 246(11), 2161-2174.
  94. Rocha-Mendoza, D., Kosmerl, E., Krentz, A., Zhang, L., Badiger, S., Miyagusuku-Cruzado, G., ... & García-Cano, I. (2021). Invited review: Acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1262-1275.
  95. Ruiz, M. J., Etcheverría, A. I., Padola, N. L., Krüger, A., & Medina, L. (2019). Massive sequencing of artisan cheeses from raw sheep's milk.
  96. Rüstemoğlu, M., Erkan, M. E., Cengiz, G., & Hajyzadeh, M. (2023). Bacterial metagenome profiling of hand-made herby cheese samples utilizing high-throughput sequencing to detect geographical indication and marketing potential. *Heliyon*, 9(2), e13334. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e13334>.
  97. Sameli, N., Sioziou, E., Bosnea, L., Kakouri, A., & Samelis, J. (2021). Assessment of the spoilage microbiota during refrigerated (4 °C) vacuum-packed storage of fresh Greek Anthotyros whey cheese without or with a crude enterocin A-B-P-containing extract. *Foods*, 10(12), 2946. <https://doi.org/10.3390/foods10122946>
  98. Sattin, E., Andreani, N. A., Carraro, L., Lucchini, R., Fasolato, L., Telatin, A., Balzan, S., Novelli, E., Simionati, B., & Cardazzo, B. (2016). A Multi-Omics Approach to Evaluate the Quality of Milk Whey Used in Ricotta Cheese Production. *Frontiers in microbiology*, 7, 1272. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01272>.
  99. Solak, B.B., & Akın, N. (2012). Health Benefits of Whey Protein: A Review. *Journal of Food Science and Engineering*, 2.
  100. Soumati, B., Atmani, M., Benabderrahmane, A., Benjelloun, M. (2023). Whey Valorization – Innovative Strategies for Sustainable Development and Value-Added Product Creation. *Journal of Ecological Engineering*, 24(10), 86-104. <https://doi.org/10.12911/22998993/169505>
  101. Souza, J.L., Silva, M.A., Silva, R.C., Carmo, R.M., Souza, R.G., Célia, J.A., Oliveira, K.B., Plácido, G.R., Lage, M.E., & Nicolau, E.S. (2016). Effect of whey storage on

- physicochemical properties, microstructure and texture profile of ricotta cheese. *African Journal of Biotechnology*, *15*, 2649-2658.
102. Spyrelli, E. D., Stamatiou, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., & Doulgeraki, A. I. (2020). Microbiological and metagenomic analysis to assess the effect of container material on the microbiota of Feta cheese during ripening. *Fermentation*, *6*(1), 12.
103. Tringe, S. G., & Hugenholtz, P. (2008). A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current opinion in microbiology*, *11*(5), 442-446.
104. Tsouggou, N., Slavko, A., Tspidou, O., Georgoulis, A., Dimov, S. G., Yin, J., Vorgias, C. E., Kapolos, J., Papadelli, M., & Papadimitriou, K. (2024). Investigation of the Microbiome of Industrial PDO Sfela Cheese and Its Artisanal Variants Using 16S rDNA Amplicon Sequencing and Shotgun Metagenomics. *Foods (Basel, Switzerland)*, *13*(7), 1023. <https://doi.org/10.3390/foods13071023>
105. Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H., & Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(10), 908-934.
106. Yarza, P., Yilmaz, P., Panzer, K., Glöckner, F. O., & Reich, M. (2017). A phylogenetic framework for the kingdom Fungi based on 18S rRNA gene sequences. *Marine genomics*, *36*, 33-39.
107. Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L. H., Cotter, P. D., & Sheehan, J. J. (2021). Recreating pink defect in cheese with different strains of *Thermus* bacteria. *International Journal of Dairy Technology*. doi:10.1111/1471-0307.12800
108. Yeluri Jonnala, B. R., McSweeney, P. L. H., Sheehan, J. J., & Cotter, P. D. (2018). Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>.
109. Zhang, M., Dong, X., Huang, Z., Li, X., Zhao, Y., Wang, Y., Zhu, H., Fang, A., & Giovannucci, E. L. (2023). Cheese consumption and multiple health outcomes: an umbrella review and updated meta-analysis of prospective studies. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, *14*(5), 1170–1186. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2023.06.007>.

110. Zheng, X., Liu, F., Shi, X., Wang, B., Li, K., Li, B., & Zhuge, B. (2018). Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. *Food Research International*, *105*, 733-742.
111. Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A Review on the General Cheese Processing Technology, Flavor Biochemical Pathways and the Influence of Yeasts in Cheese. *Frontiers in microbiology*, *12*, 703284. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>.
112. Zoidou, E., Andreadaki, I., Massouras, T., & Kaminarides, S. (2016). A new whey cheese analogue made from whey protein concentrate and vegetable fat with 15% olive oil. *J. Nutr. Medic. Diet Care*, *2*, 17.